

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**PROSTAGLANDINAS DEPENDIENTES DE
CICLOOXIGENASA-2: MOLÉCULAS CLAVE EN EL
CONTROL FUNCIONAL DE LOS MACRÓFAGOS**

TESIS DOCTORAL

INÉS CLAIRE OSMA GARCÍA

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**PROSTAGLANDINAS DEPENDIENTES DE
CICLOOXIGENASA-2: MOLÉCULAS CLAVE EN EL
CONTROL FUNCIONAL DE LOS MACRÓFAGOS**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Biología Molecular por:

Inés Claire Osma García

Director de Tesis:

Manuel Fresno Escudero

Madrid, 2012

Índice

Abreviaturas	1
Abstract	3
Introducción	5
1. Estudio de la respuesta inflamatoria	5
1.1. Participantes celulares durante la respuesta inflamatoria	5
1.2. Participantes moleculares durante el reclutamiento celular de la respuesta inflamatoria.	7
2. Mecanismos moleculares de la migración celular	9
2.1. Integrinas en la migración y respuesta celular	9
2.2. Activación de las integrinas y la formación de contactos focales	11
2.3. Rutas de señalización intracelular durante la migración celular	13
3. Origen, fenotipo y función de los macrófagos durante la respuesta inmune	16
3.1. Origen y fenotipo de los macrófagos	16
3.2. Activación de macrófagos derivados de monocitos inflamatorios	17
4. Prostaglandinas, inflamación y migración	20
4.1. Biosíntesis de las prostaglandinas (PGs)	20
4.2. Síntesis y función de PGE ₂ y PGF _{2α}	21
4.3. Dianas terapéuticas de Cox-2 y las PGs	23
4.4. Papel de las PGs en migración	24
Objetivos	25
Materiales y métodos	27
1. Materiales	27
1.1. Modelos animales	27
1.2. Líneas celulares y cultivos primarios	27
1.3. Tampones y medios de cultivo, anticuerpos y reactivos	30
2. Métodos	37
2.1. Inmunodetección de la expresión de proteínas (Western Blot)	37
2.2. Marcaje de proteínas extracelulares para Citometría de flujo	38
2.3. Inmunofluorescencia Confocal	38
2.4. CBA (Cytometric Beads Array)	39
2.5. Fagocitosis	40
2.6. Apoptosis	40
2.7. Adhesión <i>in vivo</i> a membrana peritoneal	41
2.8. Migración celular mediante “transwell”	42

2.9. Migración <i>in vivo</i> a nódulos linfáticos	43
2.10. Adhesión <i>in vitro</i>	43
2.11. Cuantificación de nitritos	45
2.12. Análisis de la activación de GTPasas	45
2.13. Medición de prostaglandina (PGE ₂) y citoquinas	46
2.14. Reclutamiento leucocitario en la cavidad peritoneal de ratones cox-2 ^{+/+} y cox-2 ^{-/-} y efecto de la administración intraperitoneal de las prostaglandinas PGE ₂ y PGF _{2α}	46
2.15. Presentación antigénica	47
2.16. Aislamiento de células CD11b y CD11c de los lavados peritoneales	47
2.17. Tinción de faloidina por citometría	48
2.18. Análisis Estadístico	48

Resultados 49

1. Caracterización celular durante la respuesta inflamatoria Inducida por tioglicolato 49

1.1. Análisis de las poblaciones celulares infiltradas en el foco Inflamatorio	49
1.2. Fenotipo de las células mieloides peritoneales	50
1.3. Análisis morfológicos de las células adherentes peritoneales cox-2 ^{+/+} y cox-2 ^{-/-}	53

2. Implicación de Cox-2 en el proceso de diferenciación y maduración de los macrófagos 55

2.1. Estudio de la expresión de CD11c durante el proceso de maduración de los macrófagos cox-2 ^{+/+} y cox-2 ^{-/-}	55
2.2. Expresión del receptor de GM-CSF en macrófagos peritoneales cox-2 ^{+/+} y cox-2 ^{-/-}	58
2.3. Estudio del proceso de diferenciación de macrófagos cox-2 ^{+/+} y cox-2 ^{-/-} derivados de médula ósea	59
2.4. Papel de GMCSF-R y de CD11c en el proceso de diferenciación de los macrófagos cox-2 ^{+/+} y cox-2 ^{-/-} derivados de médula ósea	60
2.5. Estudio de otras integrinas durante el proceso de diferenciación de los macrófagos cox-2 ^{+/+} y cox-2 ^{-/-} derivados de médula ósea	62

3. Papel de Cox-2 en fagocitosis y en presentación de antígeno 62

3.1. Efecto de COX-2 en la capacidad fagocítica de los macrófagos Peritoneales	63
---	----

3.2. La ausencia de Cox-2 implica una reducción en la expresión de iNOS y en la producción de NO inducida por LPS e IFN γ	64
3.3. Papel de COX-2 en la activación de macrófagos peritoneales	66
3.4. Expresión de citoquinas y quimioquinas secretadas por los macrófagos peritoneales cox-2 ^{+/+} y cox-2 ^{-/-} activados con LPS	70
3.5. Efecto de Cox-2 en la presentación de antígeno de los macrófagos peritoneales a células T	71
4. Implicación de Cox-2 en la adhesión y migración de los macrófagos	73
4.1. Papel de COX-2 en la migración de macrófagos hacia el foco Inflamatorio	73
4.2. La expresión de Cox-2 es fundamental para la migración de macrófagos peritoneales	74
4.3. Estudio <i>in vivo</i> del papel de Cox-2 en la emigración a nódulos linfáticos y adhesión a la membrana peritoneal de macrófagos cox-2 ^{+/+} y cox-2	76
4.4. Análisis de la expresión de integrinas en macrófagos	79
4.5. Papel de Cox-2 en la adhesión celular y reorganización del citoesqueleto de actina	80
4.6. La deficiencia en Cox-2 altera la señalización dependiente de PI3K	83
4.7. Cox-2 tiene un papel clave en la migración de los macrófagos mediada por PI3Ks	85
5. Efecto de las prostaglandinas en la migración y adhesión de macrófagos peritoneales	88
5.1. Papel de PGE ₂ y PGF _{2α} en la migración de macrófagos	87
5.2. Papel de las prostaglandinas PGE ₂ y PGF _{2α} en la expresión de integrinas de membrana	92
5.3. Efecto de las PGs en la migración <i>in vivo</i> de células mieloides	94
5.4. Papel de PGE ₂ y PGF _{2α} en la adhesión de macrófagos	94
5.5. Papel de las PGs en la formación de contactos focales	95
5.6. PGE ₂ revierte el defecto en adhesión de los macrófagos deficientes en Cox-2	97
Discusión	99
I. Implicación de Cox-2 en la respuesta inflamatoria y en el proceso de diferenciación y maduración de los macrófagos	99
II. Papel de Cox-2 en fagocitosis y en presentación de antígeno	102

III. Implicación de las prostaglandinas dependientes de Cox-2 en la migración de los macrófagos	104
IV. Efectos de PGE₂ en la migración y adhesión de los macrófagos	108
Conclusiones	113
Bibliografía	115
Material suplementario	137
Anexo I: Artículos publicados	139

Abreviaturas

Abreviatura	Definición
AA	Ácido Araquidónico
AINEs	Drogas anti-inflamatorias no esteroideas
Akt/PKB	Proteína quinasa B
AMP	Adenosilmonofosfato cíclico
BMMΦ	Macrófagos derivados de médula ósea
BSA	Albúmina de suero bobino
CCL	Quimioquina con motivo C-C
CCR	Receptor de quimioquina con motivo C-C
CD11a	Integrina alpha L
CD11b	Integrina alpha M
CD11c	Integrina alpha X
CD11d	Integrina alpha D
CD18	β_2 integrina
CD29	β_1 integrina
C/EBP	Proteína de unión al potenciador CCAAT
Cele	Celecoxib
Cox-1	Ciclooxigenasa 1
Cox-2	Ciclooxigenasa 2
cPGEs	Prostaglandina E sintasa citosólica
dbAMPc	Dibutiril-adenosilmonofosfato cíclico
Egr-1	Factor de crecimiento temprano 1
EP	Receptor PGE ₂
ERK	Proteína quinasa regulada extracelularmente
FAK	Quinasa de adhesión focal
FP	Receptor PGF _{2α}
FITC	Fluorescein isotiocianato
GEFs	Factores de intercambio de guanina
GM-CSF	Factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos
GM-CSF-R	Receptor de GM-CSF
GTP-asas	Enzima Guanosina trifosfatasa
H	Hora
iC3b	Proteína reguladora del complemento
ICAMs	Moléculas de adhesión intercelular
IFN- γ	Interferón gamma
I κ B	Inhibidor de NF- κ B
IL	Interleuquina
iNOS	Sintasa inducible de óxido nítrico
i.p.	Intraperitoneal
IP-10	Proteína 10 inducida por IFN- γ
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Quinasa activada por mitogenos
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MCS-F	Factor de estimulación de colonias de macrófagos
MEC	Matríz Extracelular
Min	Minutos
MIP-1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alpha

MMPs	Metaloproteasas
mPGEs-1	Prostaglandina E sintasa microsomal 1
mPGEs-2	Prostaglandina E sintasa microsomal 2
NF-κB	Factor nuclear κB
NO	Óxido nítrico
PAK1	Quinasa 1 activada por la proteína p21
PBS	Solución de tampón salina
PDK1	Quinasa dependiente de fosfoinositoles
PE	Ficoeritrina
PGs	Prostaglandinas
PGD₂	Prostaglandina D₂
PGE₂	Prostaglandina E₂
PGEs	Prostaglandina E sintasa
PGF_{2α}	Prostaglandina F₂ alpha
PGH₂	Endoperóxido de prostaglandina
PI3K	Fosfatidil inositol-3 quinasa
PIP2	Fosfatidil inositol-3,4 bifosfato
PIP3	Fosfatidil inositol-3, 4, 5 trifosfato
PKC	Proteína quinasa C
PLA₂	Fosfolipasa A₂
RANTES	Ligando de quimioquina 5 con motivo C-C
Rap1	GTP-asa 1 relacionada con Ras
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero Fetal Bovino
TCR	Receptor de linfocitos T
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral α
TXs	Tromboxanos
VCAMs	Moléculas de adhesión celular vascular
VLA-4	Integrinas α4β1

Abstract

Cyclooxygenase-2 (Cox-2) dependent prostaglandins (PGs) modulate many functions in a great variety of pathophysiological processes that require cell activation and cell migration. Cox-2 deficiency has been shown to decrease inflammation in mice. Here, we show that Cox-2 contributes to the development of inflammation.

Accumulation of F4/80⁺ CD11b⁺ CD11c⁺ macrophages into the peritoneal cavity upon thioglycolate challenge was diminished in Cox-2 knockout mice compared to wild type mice. Cox-2 deficiency in macrophages resulted in a reduced expression of CD11c. Maturation of monocytes to activated macrophages was altered in the absence of Cox-2 which was related to lower levels of GM-CSF-R in Cox-2^{-/-} macrophages and also in a decreased expression of CD11c.

Cox-2 deficient macrophages showed reduced cell activation, evidenced by a reduced degradation and phosphorylation of IκB, reduced expression of iNOS and diminished ability to clear bacteria. Besides, Cox-2-deficient macrophages had an impaired ability to activate T lymphocytes, due to reduced expression of MHCII, CD40, CD80 and CD86 molecules.

We have also addressed how migration of cox-2 deficient leukocytes occur using *in vivo* and *in vitro* models. Cox-2^{-/-} macrophages did not migrate in response to MCP-1, RANTES or MIP-1α, and had an impaired adhesion to ICAM-1 or Fibronectin *in vitro*. These results were reproduced in wild type macrophages in which Cox-2 activity was blocked with pharmacological inhibitors. *In vivo* studies showed that cell emigration from the peritoneal cavity to lymph nodes, as well as cell adhesion to the peritoneal mesothelium was impaired in the absence of Cox-2. The defect in cox-2^{-/-} macrophage migration was not due to changes in chemokine receptor expression. Molecular studies using cox-2^{-/-} macrophages showed a deficiency in focal adhesion formation with reduced ability to phosphorylate paxillin (Tyr188). Phosphatidylyl-3 kinase (PI3K) signalling pathway was also defective due to reduced p110γ expression. Reduced p110 γ led to a diminished phosphorylation of Akt and a reduced activation of Cdc42 and Rac-1. Interestingly, short term inhibition of Cox-2 enzymatic activity also resulted in decreased levels of p110γ. Thus, our results indicate that cox-2^{-/-} macrophages have a defective axis Paxillin/PI3K/Akt/Rac1-Cdc42, which results in severely impaired adhesion and migration.

Finally, we studied the effects of different concentrations of PGE₂ and PGF_{2α} in macrophage activation, macrophage migration to different chemokines and cell adhesion to ICAM-1 and fibronectin. PGE₂ and PGF_{2α} affected cell adhesion and migration in a dose- dependent. PGE₂ is able to increase adhesion and p110γ expression and reverse the

defective adhesion of $\text{cox-2}^{-/-}$ macrophages. Nonetheless, those effects varied depended on inflammatory or not PGE_2 concentrations.

Introducción

1. Estudio de la respuesta inflamatoria.

Durante las últimas décadas hemos sido testigo de un gran avance en cuanto al conocimiento de la inmunología, la cual nos ha permitido definir patologías humanas causadas principalmente por la respuesta inflamatoria. Casi todas las patologías inflamatorias están restringidas a órganos diana particulares o componentes tisulares específicos. Ejemplos son las enfermedades inflamatorias que afectan a la piel (Psoriasis), al intestino (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), al sistema nervioso central (esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer). También la artritis reumatoide, el asma, aterosclerosis, diabetes juvenil, entre otras muchas más. Éste tipo de patologías tienen un detonante común que implica la infiltración en un tejido específico de diferentes tipos celulares que inicien la respuesta inflamatoria.

1.1. Participantes celulares durante la respuesta inflamatoria.

Los principales participantes celulares son **los leucocitos**, que son capaces de atravesar el endotelio y migrar a los focos de infección donde iniciarán la respuesta inmune innata. La primera línea de defensa que actúa en el foco inflamatorio son los granulocitos, que incluyen a neutrófilos, basófilos y eosinófilos. **Los neutrófilos** son los más abundantes y esenciales para combatir infecciones bacterianas o debidas a hongos. Se caracterizan por tener una vida corta acumulándose unas pocas horas en el foco inflamatorio (Luster et al., 2005). Una vez ahí fagocitan al patógeno y liberan gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que tiene como consecuencia un daño tisular significativo como se muestra en enfermedades como la artritis reumatoide. Por lo tanto es esencial controlar su reclutamiento en los tejidos diana debido a que son sensible a una gran diversidad de quimioatrayentes que les hacen alcanzar los lugares de infección de una forma rápida y fiel. Tras la infiltración y actuación, los neutrófilos entran en apoptosis regulada por factores como FasL, TNF, caspasas, la familia Bcl-2, las propias ROS e incluso el patógeno (Kobayashi et al., 2003). Como consecuencia sus restos celulares atraen a los macrófagos que contribuirán a la resolución de la inflamación (Kobayashi et al., 2010).

A diferencia de los neutrófilos los monocitos presentan una vida larga y se diferencian en el foco de inflamación en macrófagos o células dendríticas. **Las células dendríticas** se encuentran dispersas por los tejidos aunque son más abundantes en los órganos linfoides, actuando como centinelas del sistema inmune innato. En respuesta a señales inflamatorias

las células dendríticas residentes en el tejido maduran y una vez que han procesado el patógeno invasor expresan el receptor CCR7 cuyo ligando es la quimioquina CCL21 (Luster et al., 2005). Esto les va a permitir entrar en los vasos linfáticos y una vez que llegan a los nódulos linfoides actúan como células presentadoras del antígeno a las células T inmaduras, las cuales se activan, proliferan y entran en el torrente sanguíneo para actuar en el foco de la inflamación (Weninger et al., 2001; Xie et al., 1999).

Por otro lado también participan **los macrófagos** los cuales son células fagocíticas derivadas de la médula ósea y que representan uno de los elementos principales en la inmunidad innata capaz de responder tanto a células cancerígenas, bacterias y virus. También tienen un papel importante en procesos inflamatorios como la aterosclerosis siendo capaces de acumular lípidos y convertirse en células espumosas (Burleigh et al., 2002; Linton & Fazio, 2003). Los macrófagos residentes procedentes de monocitos de sangre periférica se acumulan en los tejidos por señales constitutivas o inflamatorias, y una vez inmersos en el tejido presentan una gran variación morfológica y de funciones fisiológicas actuando en procesos de iniciación, resolución y reparación en el foco inflamatorio (Bellingan et al., 1996; Lucas & Greaves, 2001). En un modelo de peritonitis inducida por tioglicolato los macrófagos son los leucocitos que se acumulan en la cavidad peritoneal donde van a secretar diversos factores relevantes para la defensa de la cavidad peritoneal, como citoquinas e interleuquinas (IL) (IL-6, IL-1 α , IL-1 β , TNF- α), quimioatrayentes (IL-8, MCP-1) y prostaglandinas (Bauermeister et al., 1998; Lewis & Holmes, 1991; Topley et al., 1993).

A su vez las células mesoteliales son también participantes activos en la defensa inmune de la cavidad peritoneal formando una barrera final para los macrófagos entrantes y también fuente de quimioatrayentes leucocitarios (Hjelle et al., 1995). Una vez que el macrófago actúa en el foco inflamatorio durante el proceso de resolución, es capaz de migrar desde la cavidad peritoneal hacia los nódulos linfáticos actuando como célula presentadora de antígeno a las células T (Bellingan et al., 1996; Broche & Tellado, 2001; Cao et al., 2005).

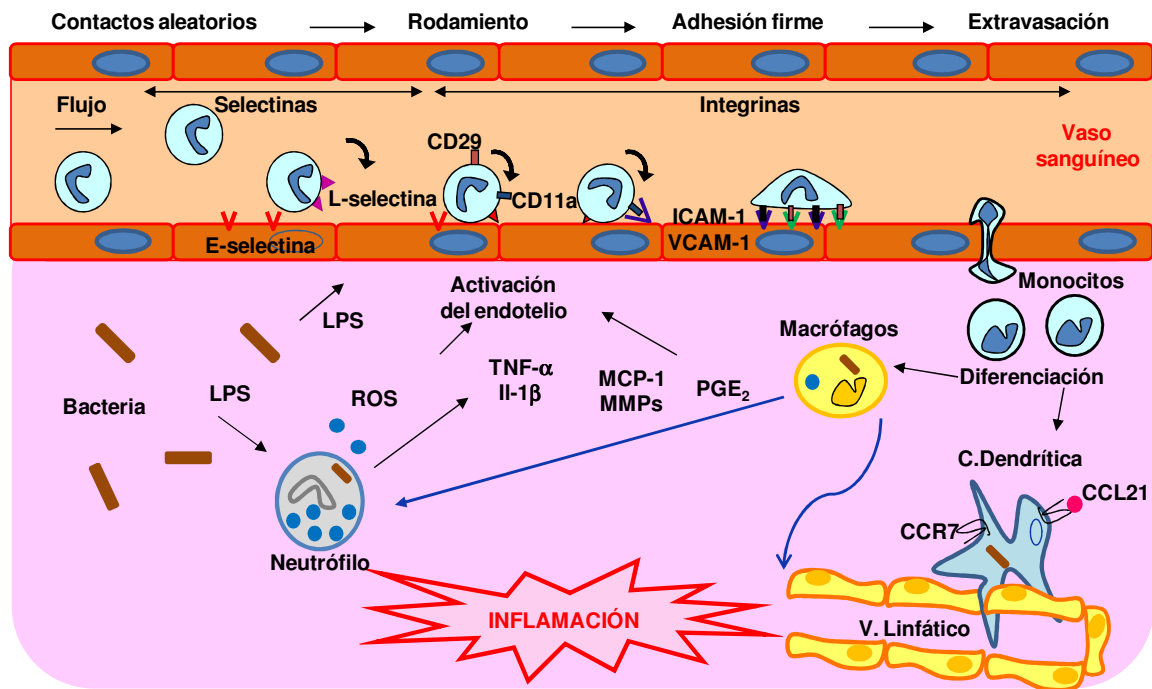
1.2. Participantes moleculares durante el reclutamiento celular de la respuesta inflamatoria.

En el sistema inmune el reclutamiento leucocitario hacia el foco de inflamación está controlado por un conjunto de agentes quimiotácticos y por moléculas de adhesión que van a ser expresados tanto por las células endoteliales como por los leucocitos (Ley et al., 2007). Durante la inflamación las células endoteliales son activadas por citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-12, y también por mediadores inflamatorios incluyendo NO (óxido nítrico), producido por la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) y prostaglandina E₂ (PGE₂), generada por la enzima Cox-2 (Ciclooxigenasa 2) (Dormond & Ruegg, 2003; Kobayashi et al., 2010). El número de atrayentes leucocitarios conocidos hoy en día se ha ampliado a su vez con la caracterización de la extensa familia de quimioquinas, que en gran medida controlan la migración de los leucocitos. Muchas de ellas se clasifican en el grupo α o C-X-C, donde podemos encontrar a las quimioquinas SDF-1, IL-8/NAP-1, IP-10, y el grupo β o C-C, donde se encuentran RANTES, MCP-1, MIP-1 α y β , CCL21 entre otras (Baggiolini, 1998; Rollins, 1997). Las quimioquinas atraen a diferentes subconjuntos de células leucocitarias en función del patrón de expresión de los receptores de las mismas, el cual es heterogéneo entre los leucocitos y está altamente regulado a nivel transcripcional (Loetscher et al., 1996).

Otro de los elementos clave para la migración leucocitaria hacia el foco de inflamación son las moléculas de adhesión que se expresan en la superficie celular y median la adhesión tanto de célula-célula como célula-matriz extracelular (MEC). En primer lugar actúan las selectinas que van a permitir contactos ocasionales entre el leucocito y las células endoteliales con el objetivo de frenar la velocidad del leucocito y atraerlo hacia el foco inflamatorio, el cual está señalizado por una serie de quimioquinas atrayentes. A este proceso se le denomina rodamiento y en él participan las L-selectinas, expresadas en leucocitos, las E-selectinas, específicas de las células endoteliales y P-selectinas, que se encuentran en plaquetas y también en células endoteliales. Por otro lado cabe destacar el papel de las inmunoglobulinas. Entre ellas encontramos la subfamilia de las moléculas de adhesión intercelular (ICAM). Dentro de éste grupo destaca ICAM-1 que es ampliamente expresada en condiciones basales y que está regulada positivamente por citoquinas pro-inflamatorias tanto en leucocitos como en células endoteliales, mientras que ICAM-2 también la podemos encontrar en plaquetas sin ser apenas regulado por factores pro-inflamatorios. También está ICAM-3 que se caracteriza por ser la única en expresarse en

las células endoteliales además de los neutrófilos (Blankenberg et al., 2003). Los ligandos de éstas ICAM son diferentes integrinas de membrana, heterodímeros glicoproteicos transmembrana con una cadena α y una cadena β , cuya unión va a permitir que los leucocitos mantengan uniones estrechas con las células endoteliales, capaces de vencer la fuerza del flujo sanguíneo y de señalizar a su vez la polarización del leucocito, lo cual supone una reorganización completa de la estructura del citoesqueleto de actina (Barreiro et al., 2007; Kim et al., 2003). Este proceso de polarización marca el comienzo de la extravasación leucocitaria a través del endotelio. Las integrinas presentan diferentes conformaciones, una inactiva menos adhesiva por presentar una menor afinidad por el ligando y otra activa con una mayor afinidad. Las integrinas más relevantes en la migración de los leucocitos pertenecen a la familia de las $\beta 2$ integrinas (CD18), las cuales se asocian no covalentemente con diferentes cadenas α , como por ejemplo $\alpha L\beta 2$ (CD11a), $\alpha M\beta 2$ (CD11b), $\alpha X\beta 2$ (CD11c) y $\alpha D\beta 2$ (CD11d). También los leucocitos expresan integrinas tipo $\beta 1$ como CD29 (Evans et al., 2009). Una vez que el leucocito ha atravesado la barrera endotelial tiene que desplazarse a través de la matriz extracelular hasta el foco inflamatorio siguiendo un gradiente quimioatrayente. Durante este desplazamiento, el leucocito sintetiza metaloproteasas (MMPs) y otras proteasas con el objetivo de degradar la matriz extracelular a su paso por la misma (Brinckerhoff and Matrisian, 2002) (Figura A).

La interacción secuencial de estas moléculas durante el proceso inflamatorio es esencial. Así pacientes con el síndrome de deficiencia de adhesión leucocitaria, debido a defectos en la expresión de integrinas o de selectinas, tienen una menor habilidad de activar la expresión de diferentes moléculas tras un estímulo inflamatorio, lo que da como resultado una mayor recurrencia a infecciones bacterianas y de hongos (Kinashi et al., 2004). También existen tratamientos para enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn o de la esclerosis múltiple que consisten en el empleo de anticuerpos monoclonales de la cadena $\alpha 4$ que bloquean la unión $\alpha 4\beta 1$ con la inmunoglobulina endotelial VCAM-1, reduciéndose así el tráfico leucocitario al foco de inflamación (Luster et al., 2005). Las moléculas de adhesión solubles en el torrente como ICAM-1, E-y P-selectinas, se emplean como biomarcadores de enfermedades como la aterosclerosis, o también para enfermedades coronarias, (Ikeda et al., 1994; Mizia-Stec et al., 2002).



A. Los diferentes pasos clave durante la migración de células del sistema inmune a los lugares de inflamación.

La inflamación producida por una infección induce la liberación de citoquinas y quimioatrayentes por células del sistema inmune residentes. Éstas activan las células endoteliales que a través de la selectinas e integrinas expresadas en las mismas, conduce a la extravasación final de los leucocitos hacia el foco inflamatorio. Una vez ahí se diferencian en células más especializadas como macrófagos y células dendríticas, las cuales llevarán a cabo sus actividades fagocíticas del patógeno y de neutrófilos apoptóticos para finalmente actuar como células presentadoras de antígeno a células T a través de su migración por los vasos linfáticos.

2. Mecanismos moleculares de la migración celular

La migración es un proceso secuencial altamente integrado que contribuye a la morfogénesis embrionaria, la reparación tisular y regeneración, y que a su vez conduce a la progresión de enfermedades como el cáncer (metástasis), aterosclerosis y artritis.

2.1. Integrinas en la migración y respuesta celular.

Las integrinas tienen un papel clave en la migración leucocitaria y la activación del sistema inmune. Son capaces de señalizar de manera bidireccional tanto fuera de la membrana plasmática como hacia dentro de la misma (Abram & Lowell, 2009). Cada una de esas vías de señalización está mediada por los cambios conformacionales de la

estructura de las integrinas. Las $\beta 2$ integrinas expresadas en los leucocitos están reguladas al alza durante la inflamación, contribuyendo a la adhesión y a la respuesta funcional de los leucocitos durante su infiltración en numerosas condiciones patológicas. Las integrinas CD11b y CD11c expresadas en células del linaje mieloide, están involucradas en la extravasación, diferenciación y fagocitosis (Gahmberg et al., 1997; Springer, 1990). La expresión y la actividad funcional de CD11b y CD11c están reguladas durante la diferenciación y activación de los leucocitos (Cabanas & Sanchez-Madrid, 1999). CD11b se expresa en células del linaje mielo-monocítico (Altieri et al., 1990), mientras que la expresión elevada de CD11c queda limitada a monocitos/macrófagos y células dendríticas (Ross et al., 1992). Las integrinas CD11b y CD11c presentan numerosos ligandos endoteliales y extracelulares, como fibronógeno, ICAM-1 y componentes del complemento como iC3b (Diamond et al., 1993) y ambas son almacenadas en vesículas intracelulares que tras un estímulo quimioatrayente se transportan a la membrana para su señalización extracelular (Springer, 1990; Stacker & Springer, 1991).

En monocitos cultivados en presencia de GM-CSF (Factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos) CD11c junto con CD11b participa en la adhesión endotelial. Además la presencia de GM-CSF resulta en un aumento en la expresión de CD11c (Georgakopoulos et al., 2008). Diferentes poblaciones de monocitos que actúan en los lugares de inflamación emplean CD11b y/o CD11c para migrar dentro del tejido para posteriormente amplificar la respuesta inflamatoria, lo que va a permitir que los monocitos diferenciados respondan a distintos estímulos para dar lugar a diferentes respuestas en el foco inflamatorio (Weber et al., 1999). En la circulación, los monocitos de sangre periférica muestran cambios en la expresión de las integrinas CD11b y CD11c cuando atraviesan el endotelio y se diferencian en macrófagos dentro del tejido. CD11c contribuye a la adhesión del monocito a las células endoteliales activadas por estímulos inflamatorios a través de la unión a moléculas de adhesión vascular como VCAM-1 y a su vez se emplea como marcador de activación de monocitos/macrófagos. Se observa un incremento de los monocitos CD11c positivos en situaciones de hiperlipidemia por lo que presenta un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis (Wu et al., 2009). Por otro lado CD11b también participa en la adhesión de monocitos al endotelio, teniendo un papel relevante en los cambios que sufre el citoesqueleto de actina durante la expansión celular como de la adhesión durante la respuesta celular (Georgakopoulos et al., 2008). Los ratones deficientes en CD11b muestran una respuesta inflamatoria disminuida

mediada por su adhesión a fibrinógeno (Lu et al., 1997). Incluso existen terapias antiinflamatorias que consisten en bloquear CD11b previniendo la acumulación de monocitos/macrófagos en la superficie de un tejido u órgano transplantado (Tang et al., 1996).

2.2. Activación de las integrinas y la formación de contactos focales.

La activación de leucocitos conduce a cambios en la actividad de las integrinas como su clusterización y difusión lateral en la membrana plasmática en asociación con el citoesqueleto de actina (Constantin et al., 2000; van Kooyk & Figdor, 2000). Es decir la migración celular requiere de interacciones dinámicas entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina. La quimiotaxis va a producir que las células se muevan en relación a un gradiente de los ligandos específicos. Esta señal gradual será detectada por receptores específicos de la superficie celular que posteriormente será traducida a través de una maquinaria de señalización para generar una respuesta coordinada. La activación de las integrinas da como resultados cambios conformacionales de los dominios transmembrana y citoplasmáticos de las integrinas. La GTP-asa Rap1 es clave para la regulación de la activación de las integrinas. Como muchas GTP-asas, el intercambio de GDP por GTP de Rap1 es regulado por los factores de intercambio de guanina (GEFs), y algunos de ellos requieren de mensajeros secundarios como Ca^{2+} y diacilglicerol. Otra ruta de activación de Rap1 es a través de la proteína quinasa C (PKC) que también requiere de Ca^{2+} y diacilgliceroles (Han et al., 2006). Sin embargo la señalización por PKC no siempre conduce a la activación de Rap1, lo que significa que la vía PKC-Rap1 no está involucrada en la activación de todas las integrinas. Por ejemplo la activación de las integrinas $\alpha 4 \beta 1$ parece estar activada vía Rap1 pero independientemente de la activación de PKC (Ghandour et al., 2007). La activación final de Rap1 conduce a la redistribución de las integrinas formando “cluster” desde la parte delantera y trasera de la célula (Katagiri et al., 2006; Katagiri et al., 2003). Esto promueve la formación de estructuras en la membrana celular conocidas como adhesiones focales donde las integrinas unen elementos de la matriz extracelular con el citoesqueleto intracelular (Figura B).

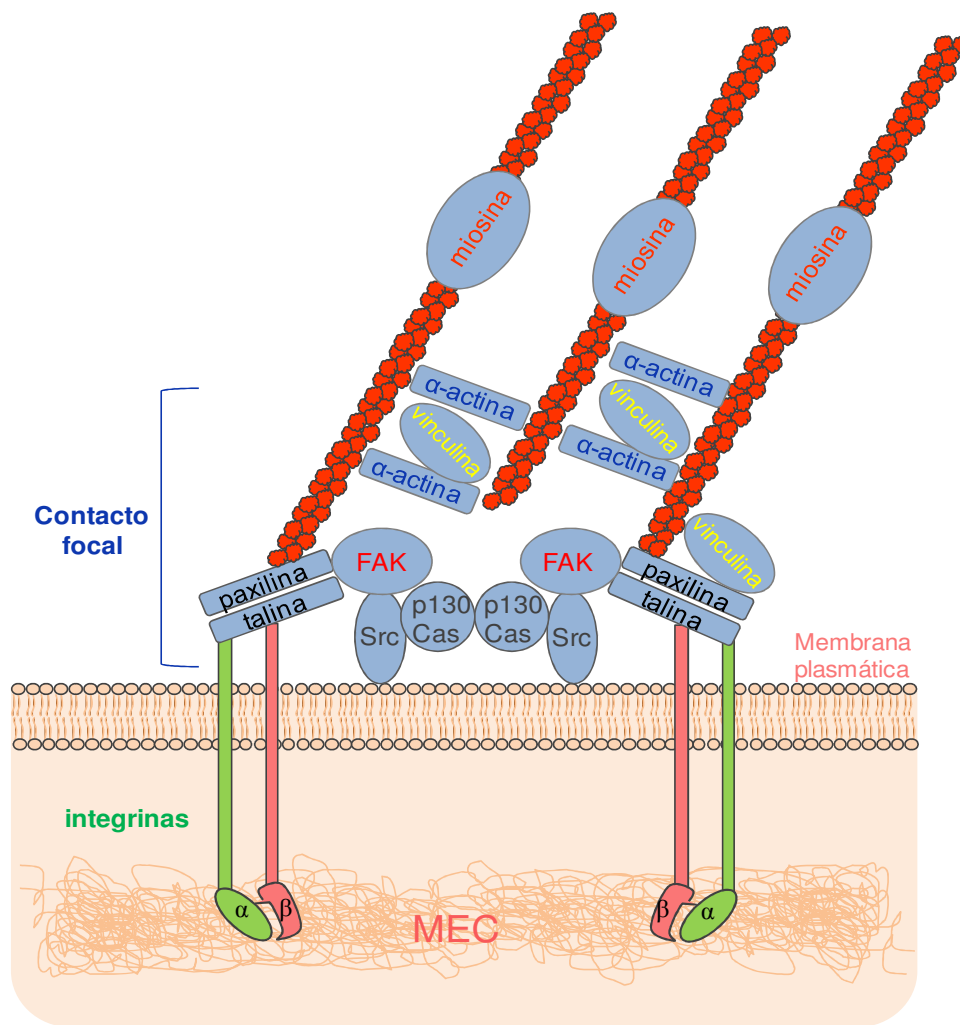


Figura B. Arquitectura molecular de los contactos focales.

La matriz extracelular, las integrinas y el citoesqueleto celular interactúan en los denominados contactos focales. Los contactos focales son grupos dinámicos de estructuras y proteínas reguladoras que transducen señales externas hacia el interior celular.

Estas estructuras proteicas juegan un papel esencial en la modulación de la adhesión celular y en la inducción de cambios en la morfología celular, involucradas tanto en la expansión de la célula como en su locomoción. Diferentes estructuras y proteínas de señalización como las integrinas, proteínas del citoesqueleto, proteínas quinasas y moléculas de señalización están concentradas en las adhesiones focales. Las proteínas de unión a actina que colocalizan con las integrinas a nivel de las placas de adhesión focal incluyen α -actina, talina, paxilina y vinculina, además de las proteínas quinasas que colocalizan también con esta estructura como la quinasa de adhesión focal (FAK), la

familia de las quinasas c-src, y PKC entre otras (Dedhar & Hannigan, 1996; Yamada & Miyamoto, 1995).

2.3. Rutas de señalización intracelular durante la migración celular.

FAK es un componente crucial en la señalización mediada por las integrinas, la cual es activada por numerosos estímulos y funciona como integradora de la señalización para controlar la motilidad celular (Mittra et al., 2005) (Figura C). La activación de FAK requiere de la autofosforilación del residuo de tirosina 397. El “clustering” de las integrinas conduce a un rápido reclutamiento de FAK al complejo de adhesión focal y de su fosforilación posterior. Esto genera por un lado un lugar de unión de gran afinidad reconocido por el dominio SH2 de la familia de quinasas Src (Toutant et al., 2002) y por otro un incremento de la actividad catalítica de FAK, lo cual es importante para la fosforilación de otras tirosinas en la adhesión focal como el de paxilina y el de Cas (Schaller, 2001; Turner, 2000). La paxilina presenta 4 lugares principales de fosforilación de tirosinas: 31, 40, 118 y 181 tirosinas. Entre todas ellas las tirosinas 118 y 31 son las que están más fosforiladas durante la adhesión y la migración celular (Nakamura et al., 2001). En condiciones de adhesión celular la unión de FAK con la familia de quinasas Src se asocia a la paxilina y a su fosforilación (Lewis & Schwartz, 1998). La activación del complejo FAK-Src implica la regulación de rutas de señalización posteriores que controlan la migración celular, la supervivencia y la expansión de la célula en contacto con la matriz, donde podemos destacar el papel de fosfatidil inositol-3 (PI3) quinasas (PI3K) (Chen et al., 1996) y la cascada de activación de las “Mitogen activated protein” quinasas (MAPK), MEKs y ERK (Schlaepfer et al., 1994).

Las PI3Ks son heterodímeros que presentan una subunidad reguladora p85 o p101 y una subunidad catalítica p110 (Stein & Waterfield, 2000). Dos de las subunidades catalíticas p110 α y p110 β se expresan de forma ubicua, mientras que las subunidades p110 γ y p110 δ se expresan mayoritariamente en leucocitos (Hawkins et al., 2006). Inhibidores de las isoformas de PI3K están siendo utilizados como terapias contra el cáncer (Crabbe, 2007) y la inflamación por su inhibición de la migración de leucocitos (Mackay, 2008). La migración de leucocitos dependiente de PI3K es controlada principalmente por la subunidad p110 γ asociada a receptores de proteínas G incluyendo los receptores de la quimioquinas (Curnock et al., 2002; Sotsios & Ward, 2000), mientras

que las subunidades p110 α y p110 δ regulan varios aspectos de la migración en respuesta a receptores de tirosina quinasa (Graupera et al., 2008; Jarmin et al., 2008). En algunos casos la subunidad p110 δ ha sido regulada a partir de quimiotaxis dependiente de receptores asociados a proteínas G (Sotsios & Ward, 2000). La activación de las PI3K genera fosfatidil inositol-3 fosfato (PIP), fosfatidil inositol-3,4 bifosfato (PIP₂) y fosfatidil inositol-3, 4, 5 trifosfato (PIP₃) (Sotsios & Ward, 2000). Los productos generados por la activación de las PI3K están implicados en la activación de varios sistemas. Por un lado se activa la proteína quinasa B, Akt/PKB (Rameh & Cantley, 1999) y por otro lado la familia de las Rho, Rac, Cdc42 y c-Jun N-terminal quinasa (JNK) (Ma et al., 1998).

Akt (PKB), es una proteína serina/treonina quinasa que regula el metabolismo, proliferación y supervivencia celular. Estudios recientes sobre el papel de Akt en la fagocitosis, infecciones bacterianas, producción de citoquinas inflamatorias y la migración mediada por macrófagos durante la inmunidad innata, sugieren un papel importante de esta enzima en la activación funcional de los macrófagos (Lee et al., 2011). Akt presenta 3 isoformas diferentes Akt1, Akt2 y Akt3 (Fayard et al., 2005). Los macrófagos y los monocitos expresan Akt1 y Akt2 (Shiratsuchi & Basson, 2007). La activación de Akt depende de la fosforilación de la treonina 308 y de la serina 473 (Alessi et al., 1996). La fosforilación de estos residuos es dependiente de PI3K. La quinasa PDK1 (quinasa dependiente de fosfoinositoles) cataliza la fosforilación de la treonina 308 de Akt de manera dependiente de PIP₃. Al igual que PDK1, Akt presenta dominios de unión de alta afinidad por los residuos PIP₂ y PIP₃ (Alessi et al., 1997; Stephens et al., 1998). Por lo tanto los productos de la activación de PI3K están involucrados en el reclutamiento de Akt a la membrana plasmática que sufrirá cambios conformacionales exponiendo la treonina 308 y serina 473 fosforiladas para las quinasas PDK1 entre otras (Downward, 1998; Franke et al., 1997).

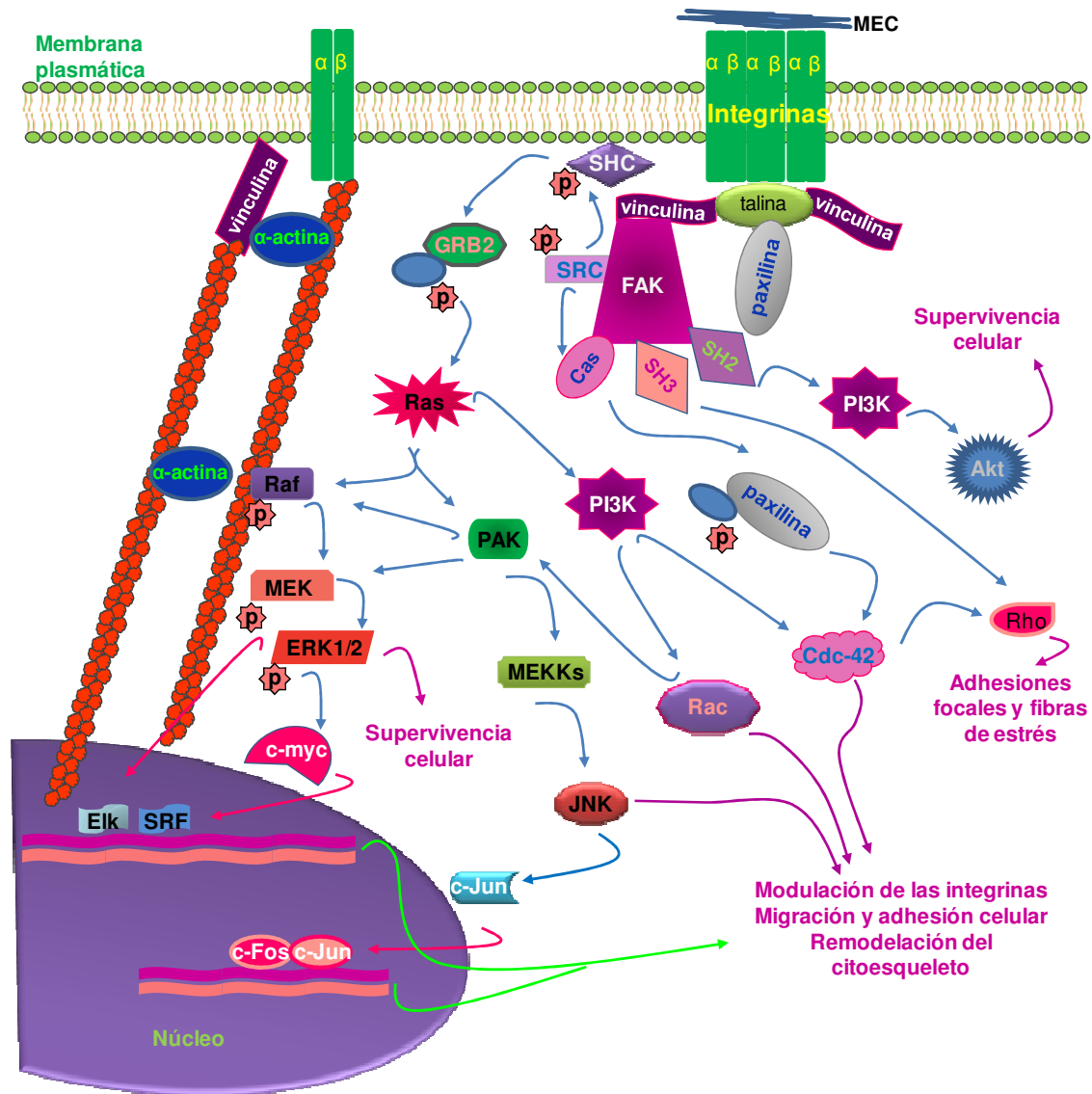


Figura C. Ruta de señalización celular mediada por integrinas.

Tras la agrupación de integrinas activadas tanto por unión a diferentes elementos de la matriz extracelular como en respuesta a quimioatrayentes específicos, da como resultado la activación de diferentes rutas de señalización. A partir de la activación de FAK por diferentes dominios de unión va a dar lugar a la participación de otras moléculas clave que inician diferentes rutas de activación encaminadas a desarrollar distintas respuestas celulares a partir del estímulo inicial. Destacamos el papel de las PI3Ks las cuales activan rutas relacionadas con la supervivencia celular y por otro lado con la migración celular. También se destaca la participación de la superfamilia de las Ras implicadas en la modulación del citoesqueleto de actina.

En numerosos tipos celulares la actividad de las PI3Ks y por tanto PIP₃, producto de su actividad, son necesarios para la activación de Rac, GTPasa de la superfamilia de las Ras-GTPasas (Hawkins et al., 1995) (Reif et al., 1996). Esta superfamilia, en la cual se incluyen también Cdc42 y Rho GTPasas, es clave para la regulación del citoesqueleto de

actina, la adhesión célula-célula, célula-matriz extracelular (MEC), polarización celular y tráfico de membrana (Burridge & Wennerberg, 2004). Para la activación de la reorganización del citoesqueleto durante la migración e incluso durante la fagocitosis, la forma activa de Rac unida a GTP interacciona con PAK1 (Daniels & Bokoch, 1999). PAK1 (Quinasa 1 activada por la proteína p21) pertenece a la familia de las quinasas serina/treonina cuya actividad catalítica es regulada por la unión de Rac y Cdc42 a un dominio altamente conservado en el extremo N-terminal denominado dominio de unión p-21 (PBD) (Benard et al., 1999). Rac y Cdc42 regulan la formación de distintas estructuras filamentosas. Rac regula la formación de lamelipodios y pliegues u ondulaciones de la membrana, mientras que Cdc42 induce la formación de filopodios (Machesky & Hall, 1996). Las formas activas de Rac1 y de Cdc42 dan lugar a la activación de la casacada de quinasas que conducen a la activación de JNK, regulando la actividad del factor de transcripción c-Jun de forma específica en función del tipo celular analizado (Coso et al., 1995).

En resumen, FAK, Akt, PI3Ks y la superfamilia de las Ras GTP-asas, van a promover la motilidad de los leucocitos a través de la barrera endotelial y en respuesta a quimioatrayentes.

3. Origen, fenotipo y función de los macrófagos durante la respuesta inmune.

3.1. Origen y fenotipo de los macrófagos.

Los monocitos son leucocitos circulantes que han sido clasificados en función de la generación de diferentes poblaciones de macrófagos no solo en condiciones fisiológicas sino también durante procesos inflamatorios e infecciosos. La inflamación periférica estimula la producción de monocitos en la médula ósea y su posterior liberación en la circulación. Los monocitos circulantes de sangre periférica son una población muy heterogénea que proporciona una fuente de células móviles funcionalmente competentes en la inmunidad innata. Los monocitos procedentes de la médula ósea se caracterizan por una expresión elevada de Ly-6C (Nikolic et al., 2003). Su naturaleza mieloide está indicada además por una elevada expresión de CD11b y F4/80. Por otro lado presentan una expresión diferencial de CD14 (parte del receptor de LPS), de CD16/CD32 (Receptores Fc) y también de receptores de quimioquinas como CCR2. Esta expresión de CCR2 y por tanto la capacidad a migrar hacia la quimioquina MCP-1 (CCL-2 ligando del

receptor CCR2), está relacionado con el importante papel de las quimioquinas y sus receptores en el reclutamiento de monocitos en el foco de inflamación, por lo que el subconjunto de monocitos CCR2⁺ se denominan monocitos inflamatorios (Kuziel et al., 1997; Serbina et al., 2003; Weber et al., 2000). Tras la migración en el foco de inflamación, los monocitos CCR2⁺, incrementan la expresión de CD11c y de MHC-II y algunos de ellos pueden migrar a los nódulos linfáticos indicando su diferenciación a células dendríticas las cuales expresan a su vez CCR7 (Geissmann et al., 2003; Qu et al., 2004).

Los monocitos comienzan parte de su maduración en la circulación, mostrando una menor expresión de Ly-6C y la habilidad de diferenciarse en macrófagos tras la estimulación con el factor de estimulación de colonias de macrófagos, M-CSF (Sunderkotter et al., 2004) (Sunderkotter et al., 2004). Los monocitos Ly-6C⁺ se diferencian a partir de precursores mieloides restringidos al linaje macrófago/célula dendrítica (Fogg et al., 2006; Liu et al., 2009). Se han identificado varios factores de transcripción implicados en uno o más estados de diferenciación de los macrófagos. Hay un primer grupo de factores de transcripción, PU.1 y AML1 (Dahl et al., 2003), necesarios para el desarrollo del macrófago debido a que controlan directamente la diferenciación de los precursores mieloides. Existe un segundo grupo que activa o reprime la expresión de genes clave para su diferenciación. Destacan los factores c-Myc, C/EBPα, NF-κB, los cuales regulan estados intermediarios de la diferenciación mieloide, y por otro están los factores C/EBPβ, Egr-1, IRF-1 y Jun/Fos (AP-1) los cuales controlarían la maduración del macrófago (Kowenz-Leutz et al., 1994; Scott et al., 1992).

3.2. Activación de macrófagos derivados de monocitos inflamatorios.

Desde hace mucho se sabe que los monocitos inflamatorios (definidos anteriormente como Ly-6C⁺ y CCR2⁺), son los que se reclutan y se diferencian a macrófagos en los lugares de inflamación (Van Furth et al., 1973). La activación de los macrófagos es un proceso complejo que puede lograrse mediante la combinación tanto de ligando de receptores de reconocimiento de patógenos como los “Toll-like receptor” (TLRs), lipopolisacáridos (LPS), y por citoquinas como IFNγ. Los macrófagos inflamatorios se caracterizan porque presentan varios estados de activación (Figura D). La denominada **activación clásica**, inducida por IFNγ y LPS, que está asociada con el incremento de la

producción de las citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1, IL-12 y TNF α), y quimioquinas como MCP-1 y MIP1 α , la activación de las enzimas iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) y NOX (NADPH oxidasa), implicadas en la producción de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno necesarias para eliminar al patógeno. Por otro lado existe un incremento de la expresión de moléculas MHCII y de moléculas co-estimuladora como CD86. Todo ello resulta en un aumento en la presentación de antígeno y de la actividad microbicida (eliminación del patógeno fagocitado). También los macrófagos pueden presentar una **activación alternativa** principalmente por el efecto de las IL-13 e IL-4 y citoquinas producidas por la respuesta TH tipo 2, activa particularmente en alergias, y respuesta humoral a parásitos y patógenos extracelulares. Se caracteriza por un incremento de los receptores de manosa y de MHCII estimulándose la actividad endocítica y la presentación de antígeno, asociado con la reparación tisular y la inmunidad humoral. Por último pueden presentar una **activación innata**, mediada por los receptores de los linfocitos T (TCRs). Los linfocitos T activan a los macrófagos mediante señales mediadas por la interacción CD40L-CD40 de los macrófagos que junto con otras moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 favorecen la presentación de antígeno. Este tipo de activación está también asociada con la producción de citoquinas proinflamatorias, de prostaglandinas como PGE₂ y con la actividad microbicida (Goerdts & Orfanos, 1999; Gordon, 2003; Mosser, 2003; Taylor et al., 2005).

Es importante tener en cuenta que los macrófagos presentan una gran variedad de funciones relacionadas con su origen monocítico que les dota de una gran plasticidad y capacidad para responder de manera diversa. Esto les confiere ser el foco de atención para múltiples terapias de una gran diversidad de enfermedades de tipología inflamatoria.

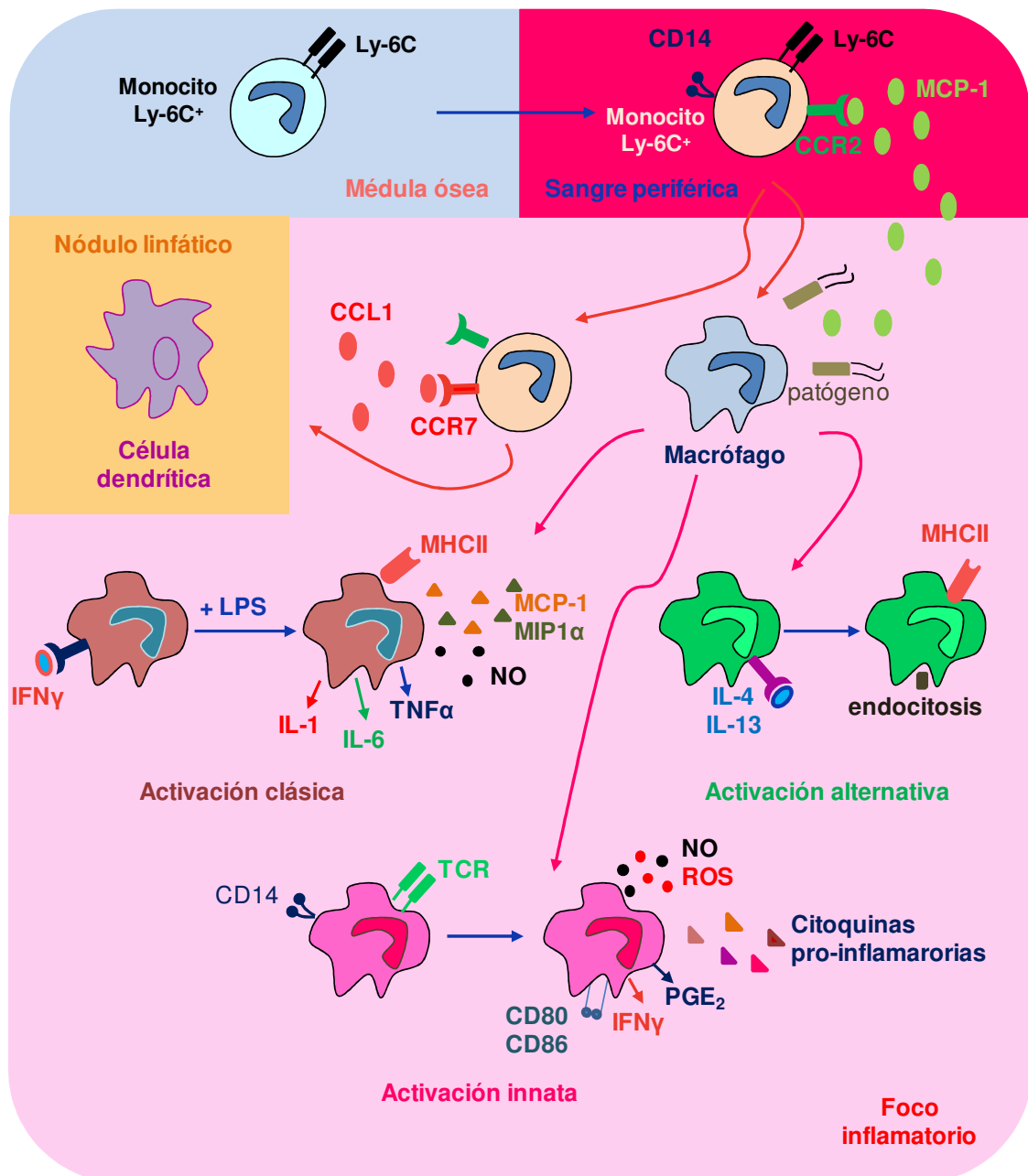


Figura D. Diferenciación y activación de macrófagos.

Los monocitos Ly-6C⁺, liberados en sangre periférica desde la médula ósea, migran hacia el foco inflamatorio. Una vez ahí se diferencian a células dendríticas expresando el receptor CCR7 necesario para migrar hacia los nódulos linfáticos, o bien se diferencian a macrófagos activándose de diferentes maneras, la activación clásica mediada por IFN γ y LPS, alternativa mediada por IL-3 e IL-14 o la innata por linfocitos T.

4. Prostaglandinas, inflamación y migración.

4.1. Biosíntesis de las prostaglandinas (PGs).

Los prostanoides, que incluyen a prostaglandinas y tromboxanos, son importantes mediadores lipídicos considerados como reguladores de la homeostasis celular y la inflamación. Están implicados en la maduración de los cuerpos lúteos, en la agregación plaquetaria o en el mantenimiento de la función renal (Mitchell & Evans, 1998; Rajakariar et al., 2006). También modulan la generación de fiebre, dolor e inflamación, actuando como potentes mediadores pro-inflamatorios en enfermedades como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn y la enfermedad de Alzheimer (Alfranca et al., 2006; Chen et al., 2008; Hoozemans & O'Banion, 2005; Iniguez et al., 2008; Iniguez et al., 2003; Kean et al., 2008; Meric et al., 2006; Wang & Dubois, 2007; Yedgar et al., 2007). Ratones deficientes en Cox-2 se caracterizan por presentar menos fiebre, debido a una menor inflamación e incluso una mayor resistencia a enfermedades producidas por bacterias y virus (Carey et al., 2005; Ryan et al., 2006). Sin embargo también algunas PGs pueden ejercer acciones anti-inflamatorias (Goodwin, 1991).

La molécula precursora de los prostanoides es el ácido araquidónico (AA) (Figura E). El AA es liberado desde la membrana plasmática por la acción de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) (Kudo & Murakami, 2002). El AA es convertido en endoperoxido de prostaglandina PGH₂ por la acción de la enzima ciclooxigenasa (Cox), que genera un metabolito intermedio PGG₂, seguida de una reacción peroxidasa. PGH₂ es el sustrato de las diferentes PG sintasas que mediante una reacción de isomerización o reducción generan las prostaglandinas de la serie E (PGE₂), F (PGF_{2α}), PGD₂, prostaciclina (PGI₂) y tromboxanos (TXs) (Alfranca et al., 2006; Smith et al., 2000).

Se han descrito dos isoformas de Cox, denominadas Cox-1 y Cox-2 (Smith & Langenbach, 2001; Tanabe & Tohnai, 2002). Cox-1 es una enzima constitutiva que produce PGs esenciales para el mantenimiento de funciones fisiológicas como la homeostasis vascular o las funciones gástricas y renales (Lopez-Parra et al., 2002). Por otro lado, Cox-2 es una enzima inducible que puede ser activada por varios estímulos pro-inflamatorios como LPS, especialmente durante la inflamación e infección (Bowman & Bost, 2004; Harris et al., 2002; Rotondo et al., 1988; Smyth et al., 2009). La unión del LPS al TLR4 provoca la activación del complejo molecular MyD88/TRAF/IRAK. A su

vez este complejo es capaz de activar la señalización mediada por ERK, JNK, p38, PKC, NF- κ B y Egr-1 entre otros induciendo la expresión de genes diana entre los cuales se encuentra la Cox-2 (An et al., 2002; Diaz-Munoz et al., 2010; Doyle and O'Neill, 2006; Vila-del Sol and Fresno, 2005).

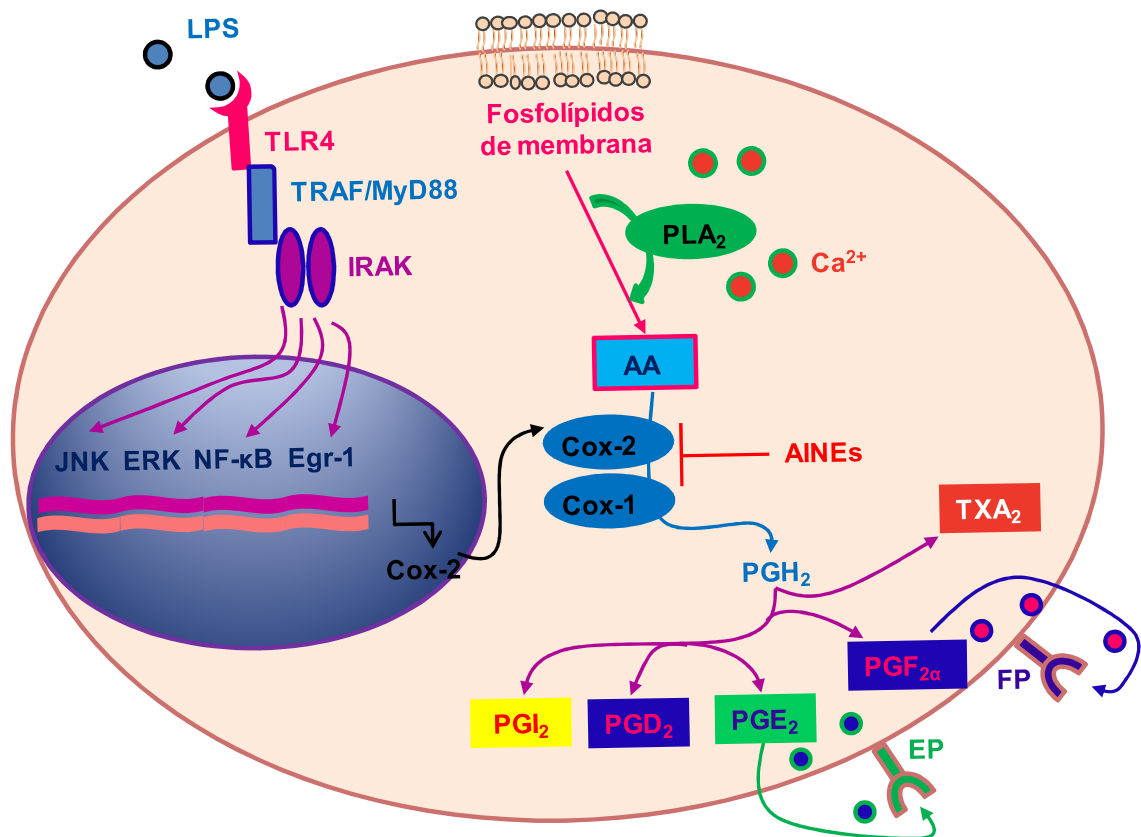


Figura E. Ruta de activación de Cox-2 y metabolismo del ácido araquidónico

La respuesta inflamatoria mediada por LPS desencadena la inducción de Cox-2 a través de la activación de varios factores de transcripción como NF- κ B. Cox-2, junto con la forma constitutiva Cox-1, participa en la síntesis de diferentes prostanoides gracias a su actividad ciclooxygenasa como peroxidasa (inhibida por la acción de las AINEs). A partir de AA genera un metabolito intermedio PGH_2 , que a través de la acción de diferentes PG sintasas dan lugar a las PGs, PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 , tromboxanos como TXA_2 y prostaciclina como PGI_2 .

4.2. Síntesis y función de PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$.

Se han descrito tres PGE_2 sintasas diferentes, una citosólica denominada cPGES y dos de unión a membrana mPGES-1 y mPGES-2. cPGES y mPGES-2 presentan una expresión constitutiva. cPGES se asocia preferentemente a Cox-1 mientras que mPGES-2 se asocia tanto a Cox-1 como a Cox-2 (Radmark & Samuelsson, 2005; Samuelsson et al.,

2007). Por otro lado mPGES-1 es generalmente inducida en respuesta a varios estímulos pro-inflamatorios y se caracteriza por presentar una distribución perinuclear asociándose a Cox-2 (Jakobsson et al., 1999; Sampey et al., 2005; Thoren & Jakobsson, 2000; Uematsu et al., 2002). La señalización de PGE₂ puede estar mediada por cuatro tipos de receptores asociados a proteínas G, EP1, EP2, EP3 y EP4. La activación de los receptores EP conduce a cambios en la producción de AMPc, de fosfoinositol y en la movilización de calcio (Ca²⁺) intracelular (Alfranca et al., 2006; Andreasson, 2010). El receptor EP1 se une a proteínas G α -q y su activación da como resultado un incremento en la hidrólisis de fosfatidil inositol y del Ca²⁺ intracelular mediante la activación de la fosfolipasa-C. Tanto los receptores EP2 y EP4 están acoplados a proteínas G α -s y su activación conduce a un incremento en la producción de AMPc y a la activación de la proteína quinasa A (PKA), aunque únicamente EP4 induce la señalización mediada por PI3K (Alfranca et al., 2006; Nishigaki et al., 1996; Regan, 2003). Por último la señalización mediada por EP3 es más compleja ya que presentan hasta 8 isoformas diferentes pudiéndose asociar a proteínas G α -s, G α -i o G α -q (Bilson et al., 2004) dando como resultado una disminución de AMPc (Sonnenburg et al., 1990).

PGE₂ presenta un amplio rango de funciones biológicas, desde efectos en la reproducción, en procesos gastro-intestinales, en el sistema inmune y sistema nervioso. Está implicada en múltiples procesos debido a su capacidad de inducir vasodilatación y vasoconstricción (Fortier et al., 2008; Iniguez et al., 2008). Su efecto más relevante y diverso es en el proceso inflamatorio. En general sirve como un importante mediador pro-inflamatorio que participa en la producción de todos los signos de la inflamación, como son el edema, el enrojecimiento, hinchazón y dolor (Funk, 2001; Harris et al., 2002), debido a que incrementa la permeabilidad microvascular aumentando así el flujo sanguíneo en las zonas inflamadas (Simmons et al., 2004). PGE₂ es capaz de regular la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF α , la IL-1 β o la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) y también citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 (Harizi & Gualde, 2006; Kunkel et al., 1988; Milano et al., 1995). Por otra parte también participa en el reclutamiento de las células dendríticas al nódulo linfático (Legler et al., 2006; van Helden et al., 2006) y en la remodelación del tejido dañado mediante la activación de las metaloproteasas (MMPs) (Pavlovic et al., 2006).

Cabe destacar el papel de PGF_{2 α} la cual es producida a partir de AA mediante la acción secuencial de Cox y de PGF_{2 α} sintasa. Ejerce sus efectos fisiológicos a través de la unión

a sus receptores específicos de tipo FP, los cuales están acoplados a proteínas G α -q y tras su activación conduce a la liberación de PIP₃ y de diacilglicerol (Abramovitz et al., 1994; Alfranca et al., 2006). La prostaglandina PGF_{2 α} es conocida por ser un factor importante en la regulación de la luteolisis o regresión del cuerpo lúteo (McCracken et al., 1970) y un regulador de la presión intraocular (Wang et al., 1990; Wang et al., 1989). Debido a que es un factor vasoconstrictor y bronquioconstrictor está involucrado en enfermedades inflamatorias crónicas y en varias disfunciones cardiovasculares como la hipertrofia cardíaca (Basu, 2007; Basu et al., 2001). Por lo tanto es un agente importante tanto en la fisiología vascular como reproductora. No se conoce mucho sobre el papel que pueda ejercer PGF_{2 α} en el reclutamiento de leucocitos al foco inflamatorio pero lo que si se conoce es que los receptores FP pueden activar a las quinasas de adhesión focal y Rho, las cuales están relacionadas con la reorganización del citoesqueleto y la morfología celular necesarias para la migración y adhesión celular (Pierce et al., 1999). Además recientes estudios han mostrado evidencias de que la señalización de PGF_{2 α} a partir de su receptor FP, regula la quimiotaxis inducida por la quimioquina CXCL1 de los neutrófilos en modelos de adenocarcinoma (Wallace et al., 2009).

4.3. Dianas terapéuticas de Cox-2 y las PGs.

Las denominadas drogas anti-inflamatorias no esteroideas (AINEs) son un grupo de compuestos farmacológicos usados para el tratamiento de procesos inflamatorios. La primera generación de AINEs bloqueaba la síntesis de PGs a través de vías no específicas de Cox-1 y Cox-2. Sin embargo el tratamiento duradero de ese tipo de drogas conllevaba a graves efectos secundarios como toxicidad renal y gastrointestinales (Abdel-Tawab et al., 2009) (Chakraborti et al., 2009) (Lai & Chan, 2009) (Simmons et al., 2004). Recientemente se han desarrollado nuevos AINEs que inhiben de forma selectiva COX-2, como es el Celecoxib (Cele) o el Rofecoxib (Gilroy & Colville-Nash, 2000). También se han desarrollado antagonistas y agonistas de los diversos receptores de PGs con el fin de controlar su señalización y acción, y que están siendo probados con éxito en diversos modelos animales. Por ejemplo el antagonista de EP4 ha demostrado ser eficaz en modelos de ratón de encefalitis autoinmune (Esaki et al., 2010) y de artritis (Chen et al., 2010).

4.4 Papel de las PGs en migración.

En la actualidad existen evidencias de que la síntesis de PGs en el foco inflamatorio puede regular la migración leucocitaria. Así los ratones deficientes en Cox-2 y mPGES-1 se caracterizan por un menor reclutamiento de células inmunes al foco inflamatorio (Dinchuk et al., 1995; Kamei et al., 2004). Durante la fase temprana de la inflamación las células mieloides producen elevadas cantidades de PGE₂, la cual ha sido definida como un potente inmunomodulador, participando en el reclutamiento de monocitos y células dendríticas al foco inflamatorio, mediante la regulación de la expresión de quimioquinas y de receptores de quimioquinas (Zeidler et al., 2000). PGE₂ es un inductor de la expresión de CCR7 necesario para la migración de las células dendríticas hacia los nódulos linfáticos en respuesta a las quimioquinas CCL2 y CCL19 (Liu et al., 2007b; Scandella et al., 2002). PGE₂ también es capaz de regular la expresión de algún otro receptor como CCR5, cuya expresión en monocitos de sangre periférica se encuentra disminuida, además de interferir en la adhesión mediada por Mac-1 (Panzer & Uguccioni, 2004; Zeidler et al., 2000). Esto sugiere que PGE₂ puede estar involucrada en la retención de monocitos y la maduración de macrófagos en el foco inflamatorio (Lang et al., 2003).

Por otro lado PGH₂ induce la migración de eosinófilos (Schuligoi et al., 2009). PGD₂ incluso induce la quimiotaxis de los eosinófilos, células dendríticas y células Th2 (Herlong & Scott, 2006). También PGF_{2α} induce la migración de neutrófilos (Arnould et al., 2001; Wallace et al., 2009) y células T (Sandig et al., 2006). Otras de las actividades de PGE₂ consiste en regular la expresión y activación de MMP-9 implicada en la migración de células dendríticas (Wu et al., 2005; Yen et al., 2008).

La migración de las células inmunes controlada por las PGs está involucrada en la generación de enfermedades. Por ejemplo la reducción de la migración de células de Langerhans, en ausencia de la señalización de PGE₂ conduce a una disminución de la hiper-sensibilidad por contacto (Matsuoka & Narumiya, 2007).

En conjunto todas estas evidencias indican una posible relación entre la expresión de Cox-2 y la capacidad de migración de las células inmunes.

Objetivos

Cox-2 es la principal diana de terapias anti-inflamatorias. Sin embargo, aún no se conocen todas las facetas por las que los eicosanoides producidos por Cox-2 afectan a la inflamación.

Por ello los objetivos propuestos para esta tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Análisis de la ausencia de Cox-2 en un modelo de peritonitis inflamatoria.
2. Implicación de Cox-2 en el proceso de diferenciación y maduración de los macrófagos.
3. Papel de Cox-2 en la activación del macrófago y en su capacidad como célula presentadora de antígeno.
4. Estudios de la implicación de Cox-2 en la adhesión y migración de macrófagos en respuesta a inflamación.
5. Efecto de las prostaglandinas en los procesos de adhesión y migración de los macrófagos peritoneales.

Materiales y Métodos

1. MATERIALES

1.1. MODELOS ANIMALES.

- **Ratones B6:129S7-Ptgs2^{tm1Jed}/J (cox-2^{-/-}):** Procedentes de “The Jackson Laboratory”. La generación de estos animales se realizó mediante la sustitución de un fragmento de 1,8 kb, conteniendo el exón 1 del gen, por el gen para la Neomicina, impidiendo la correcta transcripción del gen de la Ciclooxygenasa 2 (COX-2). Presentan el fondo genético 129SV/C57BL6 (Dinchuk, J.E., 1995).
- **Ratones silvestres.** Los animales de fondo genético 129SV/C57BL6 (cox-2^{+/+}) se usaron como controles de los ratones *cox-2^{-/-}*.
- **Ratones OTII:** Es una línea transgénica en TCR restringida en MHC-II. El TCR reconoce el péptido ISQAVHAAHAEINEAGR, derivado de la ovalbumina, en el contexto de la molécula I-A^b. Las células T de estos ratones expresan las cadenas α y β del TCR y sólo reconocen el péptido OVA (323 -339) presentado por MHC-II. Estos ratones se han empleado para los estudios de presentación antigénica.

Todos los animales fueron alimentados y mantenidos en condiciones asépticas (libre de patógenos) en el animalario del CBMSO. Todos los procedimientos realizados con los animales fueron aprobados por un comité ético del consejo superior de investigaciones científicas

1.2. LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS.

1.2.1 Líneas celulares.

- **L929:** La línea celular de fibroblastos de ratón, fue mantenida en condiciones de cultivo a 37°C y atmósfera controlada con un 97% de humedad relativa y 7% de CO₂. Se utilizó como medio de cultivo DMEM, suplementado con 10% de FCS. Esta línea celular secreta al medio M-CSF, de modo que una vez que llegaron a confluencia, se recogió el medio de cultivo (LCM) para su posterior utilización a la hora de diferenciar macrófagos derivados de médula ósea.

1.2.2 Cultivos primarios.

La obtención de macrófagos peritoneales y derivados de médula ósea, se realizó a partir de ratones de la cepa 129sv/b16 y B6:129S7-Ptgs2^{tm1Jed}/J (cox-2^{-/-})

- **Macrófagos peritoneales.**

Para la obtención de macrófagos peritoneales, se inyectó intra-peritonealmente (i.p.) 1ml de una solución de tioglicolato al 10% (p/v) por ratón (DIFCO). Pasados cuatro días los ratones se sacrificaron por inhalación de CO₂ y se inyectaron i.p. 10 ml de solución salina (PBS) frío (4°C) por ratón. Después de masajear el abdomen durante 5 minutos, se recupera el PBS inyectado que contiene a los macrófagos peritoneales. Las células se cosecharon por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos y se sembraron en diferentes placas a una densidad de 10⁶ células/ml en RPMI 5% suero fetal bobino (SFB). Después de 2 horas o toda la noche a 37°C en atmósfera controlada, se lavó cada pocillo individualmente con PBS para eliminar posibles contaminaciones con células no macrofágicas. Para los diferentes experimentos realizados se sustituyó el RPMI 5% SFB por RPMI 2% SFB.

- **Macrófagos derivados de médula ósea (BMMΦ).**

Se sacrificaron los ratones mediante inhalación de CO₂. Se obtuvieron los fémures mediante cortes a nivel de las articulaciones coxofemoral y rotuliana. Después de limpiar los fémures de tejido muscular (para evitar contaminación con fibroblastos), se realizaron dos cortes en el hueso a nivel de las epífisis proximales y distales. A continuación se perfundió el canal medular con 1 ml de DMEM completo (10% FCS). La suspensión celular fue centrifugada durante 10 minutos a 1200-1500 rpm. Los hematíes se lisaron con 1 ml de tampón de lisis durante 1 minuto en hielo. Se plaquearon 10⁶ células/ml en DMEM 10% SFB completo en placas petri.

Para diferenciar a macrófagos se empleó el sobrenadante (LCM) obtenido del cultivo de las células L929 (10%). Se cambió el medio (DMEM 10% SFB completo + 10% de LCM) durante los días 3 y 6. El día 7 se cambió el medio a DMEM 10% SFB sin LCM y se procedió a su activación con LPS (1µg/ml) durante 24-48 horas.

- **Linfocitos T obtenidos de los nódulos linfáticos.**

Se extrajeron los nódulos linfáticos poplíteos, inguinales, axilares, braquiales y cervicales superficiales de los ratones OTII. Posteriormente se disgregaron los nódulos empleando un filtro de 40 μm de poro y el embolo de una jeringa de 2ml. Se resuspendieron en medio RPMI 10% SFB para posteriormente co-cultivarlos con los macrófagos peritoneales.

- **Bacterias XL1Blue:** experimento fagocitosis.

1.3. TAMPONES Y MEDIOS DE CULTIVO, ANTICUERPOS Y REACTIVOS.**1.3.1. Tampones y medios de cultivo.**

Nombre	Composición
PBS	NaCl 137mM, KCl 2,7mM, $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 8mM, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 1,5mM
TBS	5N de NaCl, 1M Tris pH 7,6
TBS-T	TBS-0,1% Tween 20.
Tampón de lisis	Cl NH_4 , CO_3HK , EDTA 0,1M, pH 7,4
Tampón de unión a anexina	0,1 M Hepes, pH 7,4; 1,4 M NaCl; 25mM CaCl_2
Tampón de lisis Pull Down	25mM HEPES, 150mM NaCl, 1% Igepal CA-630, 10% glycerol, 25mM NaF, 10mM MgCl_2 , 1mM EDTA.
RIPA	1% NP-40, 150mM ClNa , 20mM Tris HCl pH 8, 1mM EDTA, 0,1% SDA, 0,1% DOC.
Tampón de lisis Invitrogen	10mM Tris pH 7,4, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0,1% SDS, 0,5% deoxicolato de sodio, 1% Triton-X100, 10% glycerol.
Tampón de adhesión	20 nM Hepes pH 7,4, 149 mM de NaCl, 2 mg/ml glucosa, 1mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 y 0,1% BSA.
Solución de Griess	solución de 0,1% de dihidrocloruro de naftil-etilen-diamina diluido en agua, y 1% de sulfanilamida diluida en 5% H_3PO_4 mezclados en una reacción 1:1 v/v.
PBS-staining	PBS 1x, 2% BSA o 2% FCS
Solución de bloqueo	tampón PBS, 1% BSA, 1% SFB y 0,1% tritón X100
Tampón cristal violeta	0,5% Cristal Violeta en agua-50% metanol
Medio HBSS	Hank's balanced salt solution con 20 μM de Hepes, Ca^{2+} , Mg^{2+} . Usado en los ensayos de fagocitosis.
RPMI	(Proporcionado por el CBMSO), SFB, 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomicina, 100U/ml penicilina, 1000U/ml gentamicina, 2mM L-glutamina y aminoácidos no esenciales
DMEM	(Proporcionado por el CBMSO), SFB, 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomicina, 100U/ml penicilina, 1000U/ml gentamicina, 2mM L-glutamina y aminoácidos no esenciales

1.3.2. Anticuerpos.

Nombre	Características-clon	Proveedor
Anticuerpos citometría de flujo		
anti-B220 (CD45R/B220)	conjugado con FITC (clon RA3-6B2)	BD Pharmingen
anti-CCR2 (MC-21)		cedido por el Dr. Matthias Mack,
anti-CCR5 (MC-68)		cedido por el Dr. Matthias Mack,
anti-CD11a (LFA-1 α)	conjugado con PE (clon 2D7)	BD Pharmingen)
anti- CD11b	conjugado con Alexa Fluor 647 (clon M1/70)	BD Pharmingen
anti-CD11c	conjugado con FITC (clon HL-3)	BD Pharmingen
anti-CD18	conjugado con PE (clon C71/16)	BD Pharmingen
anti-CD25	conjugado con PE (clon PC61)	BD Pharmingen
anti-CD29	conjugado con PE (clon eBioHMb1-1)	e-Bioscience
anti-CD3e	conjugado con PE-Cy7 (clon 145-2C11)	BD Pharmingen),
anti-CD4	conjugado con Alexa Fluor 647 (clon RM4-5)	BD Pharmingen
anti-CD40	conjugado con PE (clon IC10)	e-Bioscience
anti-CD68	conjugado con Alexa-647 (clon FA-11)	AbD Serotec
anti-CD69	conjugado con FITC (clon H1.2F3)	BD Pharmingen

anti-CD80	conjugado con PE (clon 16-10A1)	BD Pharmingen
anti-CD86	conjugado con FITC (clon GL1)	BD Pharmingen
anti-F4/80	conjugado con FITC (clon BM8)	e-Bioscience
anti-GMCSFRα	conjugado con APC (clon 698423)	R&D Systems
anti-ICAM-1	biotin anti-mouse CD54) (clon YN1/1.7.4)	e-Bioscience
anti-Ly6C	conjugado con PE (clon RB6-8C5)	e-Bioscience
anti-MHC clase II	I-A/I-E) conjugado con PE (clon M5/114.15.2)	e-Bioscience
anti-NK1.1	conjugado con PE (clon PK136)	e-Bioscience
Controles Isotípicos y Secundarios		
anti-Rat IgG2a,k	conjugado con PE-Cy7 (clon R35-95)	BD Pharmingen
anti-Rat IgG2a	conjugado con APC	e-Bioscience
anti-Rat IgM,k	conjugado con FITC (clon R4-22)	BD Pharmingen
anti- Rat IgG2b,k	conjugado con PE (clon A95-1)	BD Pharmingen
anti- Rat IgG2a	conjugado con Alexa 488 (clon YTH71.3)	AbD Serotec
anti- Hamster IgG1	conjugado FITC (clon G235-2356)	BD Pharmingen
anti-Rat IgG2b,k	conjugado FITC (clon A95-1)	BD Pharmingen
anti-Rat IgG2a,k	conjugados con PE (clon R35-95)	BD Pharmingen

anti-Rat IgG2b	conjugado con Alexa 647	e-Bioscience
anti-anti-rata	acoplado con Alexa 647	Invitrogen
anti-Streptavidina	conjugada con APC	BD Pharmingen
anti-rata	acoplado a Alexa 488	Invitrogen
Anticuerpos Inmunotransferencia		
anti-Actina	Policlonal (sc-1616)	Santa Cruz
anti-AKT	Policlonal (#9272)	Cell signaling
anti-pAKT	Fosforilado serina 473. Policlonal (#9271)	Cell signaling
anti-Cdc42	Policlonal (sc-87)	Santa Cruz
anti-CD11c	Policlonal (sc-26692)	Santa Cruz
anti-EP1	Policlonal (#101740)	Cayman
anti-EP2	Policlonal (#101750)	Cayman
anti-EP3	Policlonal (#101760)	Cayman
anti-EP4	Policlonal (#101775)	Cayman
anti-ERK1	Clon C-16 (sc-93)	Santa Cruz
anti-pERK	Fosforilado tirosina 204. Clon E-4 (sc-7383)	Santa Cruz
anti-FAK	Policlonal (#AMO0672)	Invitrogen

anti-pFAK	Fosforilado tirosina 397. Policlonal (#44-624G)	Invitrogen
anti-HSP-90α/β	Policlonal (sc-7947)	Santa Cruz
anti-IκBα	Clon L35A5. (#4814)	Cell Signaling
anti-pIκBα	Fosforilado serina 32 y 36. Clon 5A5 (#9246)	Cell Signaling
anti-INOS	Policlonal (sc-650)	Santa Cruz
anti-JNK1	Policlonal (sc-474)	Santa Cruz
anti-pJNK	Fosforilado tirosina 183 y 185. Clon G-7. (sc-6254)	Santa Cruz
anti-PI3K p85	Policlonal (#4292)	Cell Signaling
anti-PI3K P101	Monoclonal D32A5. (#5569)	Cell Signaling
anti-PI3K p110δ	Clon A-8 (SC-55589)	Santa Cruz
anti-PI3K p110γ	Policlonal (sc-7177)	Santa Cruz
anti-Paxilina	Clon 165. (#610620)	BD Transduction
anti-pPaxilina	Fosforilado tirosina 118 (#611725)	BD Transduction
anti-Rac1	Clon 23A8 (#05-389)	Millipore
anti-Vinculina	Policlonal (V4139)	Sigma-Aldrich

1.3.3. Reactivos.

Nombre	Características/ Referencia	Casa comercial
Anexina/7AAD	Anexina/7-amino-Actinomycin A poptosis-muerte celular (559763)	BD Pharmingen
AS252424	Inhibidor específico p110 γ (A89819)	Sigma
BCECF AM	2',7'-bis(2-carboxyethyl-5-(6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (B3051)	Invitrogen
CBA	Cytometric Bead Array (552364)	BD Bioscience
CD11b bolas magnéticas	CD11b Microbeads (130-091-100)	MACS MILTENYI BIOTEC
CD11c bolas magnéticas	CD11c Microbeads (130-052-001)	MACS MILTENYI BIOTEC
Celecoxib	Inhibidor de COX-2.	Lab. Esteve
Cristal Violeta	(C6158)	Sigma
Faloidina	Faloidina conjugada con FITC (P5282)	Sigma
Fibronectina	(F1141)	Sigma
ICAM-1	Recombinant Mouse ICAM-1/CD54 Fc Chimera (7966-IC-050)	R &D Systems
IFN-γ	Interferon-gamma (PMC4031)	Invritogen
LPS	Lipopolisacárido de <i>E. Coli</i> (L-8274)	Sigma
LY294002	Inhibidor de PI3K (L9908)	Sigma
MCP-1	Quimioquina recombinante de ratón CCL2/MCP-1 (479-JE)	R &D Systems

MIP1α	Quimioquina recombinante de ratón CCL3/MIP-1 α (450-MA)	R &D Systems
NS398	Inhibidor de COX-2 (70590)	Cayman
PAK-1 PBS, agarose conjugate	Rac/Cdc42 (PAK-1, Agarosa conjugada) (14-325)	Millipore
PGE₂	Prostaglandina E ₂ (14010)	Cayman
PGE₂, EIA kit	Kit de medición de PGE ₂ (514010)	Cayman
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α} (16010)	Cayman
PKH26	Fluorescente rojo de unión celular (028K0462)	Sigma
Ovoalbúmina	(32467)	Cambiochem
OVA péptido	Péptido de OVA323-339 (RP10610)	Genscript
RANTES	Quimioquina recombinante de ratón CCL5/Rantes (478-MR)	R &D Systems
Reactivo de Griess	(G4410-10G)	Sigma
Tioglicolato	(211716)	BD
Violet Cell Trace	Sondavioleta de proliferación celular (C34554)	Life Technologies

2. MÉTODOS.

2.1. Inmunodetección de la expresión de proteínas (Western Blot).

- Obtención de extractos totales: Para obtener extractos proteicos totales de los macrófagos peritoneales y de los BMM Φ , con el fin de detectar proteínas de interés mediante ensayos de inmunotransferencia, se trataron las células con los estímulos correspondientes durante distintos tiempos, dependiendo del experimento. Posteriormente se lisaron las células con 60 μ l de tampón de lisis RIPA o con tampón de lisis de INVITROGEN durante 30 minutos en hielo. Después se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. La concentración de los extractos totales de proteína presentes en el sobrenadante fueron determinados mediante BCA (PIERCE).
- Inmunotransferencia: Para analizar la presencia de las proteínas de estudio en los extractos proteicos totales obtenidos, se realizaron ensayos de inmunotransferencia con anticuerpos específicos. A 20-30 μ g de extracto proteico, se añadió tampón de carga Laemmli 2X, se llevó a ebullición y las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) del 8-10%. Posteriormente las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa “Trans-blot transfer médium” (BioRad) en cámara húmeda con Tris-glicina 20% (v/v) metanol. Transcurridos 90 minutos, las membranas fueron incubadas en solución de bloqueo TBS-T (TBS-0,1% Tween 20) con 5% leche en polvo desnatada o con TBS-T con 5% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se incubó el anticuerpo primario en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche. Tras lavar la membrana 3 veces con TBS-T, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron con TBS-T 2 veces y una última con TBS sin Tween 20. Para identificar las bandas específicas, se utilizaron los métodos de quimioluminiscencia “ECL” (Amersham) y SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce).

2.2. Marcaje de proteínas extracelulares para Citometría de flujo.

Para la tinción de proteínas de membrana empleamos anticuerpos conjugados con diferentes fluorocromos. Según el tipo de experimento realizado, una vez terminados los diferentes tratamientos de estudio, se centrifugaron las células y se lavó el pellet con PBS-staining (PBS 1x, 2% BSA o 2% FCS). Se resuspendieron en 50 µl de PBS-staining y se bloquearon los receptores Fc de los macrófagos para evitar uniones inespecíficas, mediante incubaciones de 10-20 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo purificado CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block) (clone M1/70, BD Pharmingen). Posteriormente se incubó con la combinación de anticuerpos marcados con fluorocromos en un volumen final de 50 µl durante 20 minutos a 4°C y en oscuridad. Los anticuerpos utilizados para marcar las células y los controles isotípicos y secundarios se recogen en las tablas de las páginas 31-34.

Posteriormente se lavó el sedimento celular (“pellet”) varias veces con PBS-“staining”. En los casos en el que el anticuerpo primario no estuviera marcado, se resuspendieron las células en 50 µl de PBS-“staining” y se incubaron con diferentes diluciones de anticuerpo secundario marcado durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente se realizaron varios lavados con PBS-“staining”. Algunas de las muestras celulares que se estudiaron en diferentes días se fijaron con formalina al 2% en PBS durante 20 minutos en oscuridad y posteriormente se realizaron varios lavados con PBS. Al final se analizaron las muestras en el citómetro de flujo (FACSCanto II (BD Biosciences) y se analizaron los resultados mediante el uso del programa Flowjo 4.1 software (Tree Star, Inc).

2.3. Inmunofluorescencia Confocal.

La localización subcelular de proteínas se realizó mediante inmunofluorescencia para su posterior análisis mediante microscopía confocal. Los macrófagos peritoneales se crecieron hasta un 50% de confluencia sobre cubreobjetos antes de realizar los tratamientos con PGE₂ (2µM). Los cubreobjetos con las células adheridas, se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 10-20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS (3X) y se eliminó la autofluorescencia de las células mediante la incubación de los cubreobjetos en NH₄Cl (50mM) en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS y se permeabilizó la membrana celular con tritón X-100, 0,1% en PBS, durante 10 minutos a temperatura

ambiente. Se procedió después al bloqueo de los receptores Fc con una dilución 1:50 del anticuerpo CD32/CD16 durante 10-20 minutos. Posteriormente se bloquearon las células con solución de bloqueo (tampón PBS, 1% BSA y 0,1% tritón X100) durante 15 minutos. Los cubreobjetos se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo primario de la vinculina, diluido en la solución de bloqueo a temperatura ambiente en cámara húmeda. Tras varios lavados con PBS, se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundarios acoplados a fluorocromos que reconociesen específicamente la región Fc del anticuerpo primario utilizado y con faloidina, ambos diluidos en la solución de bloqueo. Se lavaron las muestras con varios lavados con PBS y un último de agua destilada y se procedió a su montaje con Prolong (Invitrogen). Antes del montaje se realizó la tinción de los núcleos incubando las muestras con DAPI (Calbiochem) durante 3 minutos.

Las imágenes se capturaron en el microscopio “Confocal Radiance 2000” y con la cámara CCD-monocroma color de Zeiss, y se analizaron la imágenes con el software Image J 1.44c (National Institute of Health, USA).

2.4. CBA (Cytometric Beads Array).

La técnica del CBA emplea una serie de microesferas con intensidades de fluorescencia discretas y de tamaño conocido para que simultáneamente se puedan detectar múltiples partículas solubles en una determinada muestra; todo ello combinado con la tecnología de la citometría de flujo.

En nuestro caso empleamos un kit CBA de inflamación de ratón (Mouse Inflammation Kit, BD Cytometric Bead Array 552364), que es capaz de cuantificar la Interleuquina-6 (IL-6), Interleuquina-10 (IL-10), la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), el interferon- γ (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleuquina-12p70 (IL-12p70).

Una vez extraídos los macrófagos peritoneales de los ratones control y *cox-2^{-/-}*, se incubaron 5×10^5 en una p24 con RPMI 2% de SFB durante 1-2 horas para después realizar varios lavados con PBS, eliminando así las células que no son macrófagos. Posteriormente se trataron con LPS (1 μ g/ml) durante 24h. Se recogieron los sobrenadantes y se siguieron las indicaciones de la casa comercial.

2.5. Fagocitosis.

Cuatro días después de la inyección de tioglicolato, se extrajeron los macrófagos peritoneales procedentes de la cavidad peritoneal de ratones silvestres y *cox-2*^{-/-}. Sembramos 5×10^5 macrófagos peritoneales en una placa p24 en RPMI 2% de SFB e incubamos 1-2 horas para después lavar e eliminar así las células que no son adherentes o que no son macrófagos.

Por otro lado, dejamos crecer durante la noche las bacterias XL1Blue en LB+tetraciclina (10µg/ml). Al día siguiente se realizaron las diluciones necesarias hasta obtener un crecimiento óptimo con una densidad óptica de 0,6 y así calcular las bacterias que necesitamos para obtener una multiplicidad de infección (M.O.I) de 10, es decir, 5×10^6 bacterias y 5×10^5 macrófagos peritoneales. A continuación se resuspendieron las bacterias necesarias en medio HBSS (“Hank’s balanced salt solution” con 20 µM de Hepes, Ca^{2+} , Mg^{2+}).

Posteriormente se cambió el medio de los macrófagos por el HBSS+bacteria y se dejó incubando a 37° durante diferentes tiempos de estudio. Después se realizaron 3 lavados con PBS y se añadió gentamicina 100 µg/ml durante 1 hora para eliminar las bacterias no fagocitadas. Pasada 1 hora se volvió a realizar 3 lavados con PBS. Se lisaron las células con 0,1 % de triton X 100 en PBS durante 10 minutos, habiendo comprobado anteriormente la resistencia a gentamicina. Se añadió LB a la placa y se realizaron diluciones 1/10, cultivando en las placas de agar-tetraciclina 100 µl de la dilución. Al día siguiente se contaron las colonias bacterianas que habían crecido. Cada punto se realizó por duplicado.

2.6. Apoptosis.

En células apoptóticas, el fosfolípido de membrana fosfatidilserina (FS) es translocado desde el interior al exterior de la membrana plasmática. La Anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} que tiene una alta afinidad por FS. Por lo tanto las tinciones con Anexina V, indican la pérdida de la integridad de la membrana la cual acompaña a un estado posterior de muerte celular, resultado de procesos tanto apoptóticos como necróticos. Además, las tinciones con anexina V son típicamente conjugadas con un marcador vital como es el 7-amino-actinomicina (7-ADD) lo que permite identificar células de apoptosis temprana. De esta manera las células viables con membranas

intactas excluyen a 7-ADD, mientras que las membranas de células muertas o con daño celular son permeables al mismo.

Los macrófagos peritoneales extraídos de la cavidad peritoneal de los ratones control o *cox-2^{-/-}*, 4 días después de la inyección con tioglicolato, se lavaron con PBS frío dos veces. Después se procedió al bloqueo de las regiones Fc con CD16/CD32 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se empleó el kit de Anexina V PE conjugado con 7-ADD (BD Pharmingen). Se añadió 2,5 μ l de Anexina V PE y 5 μ l de 7-ADD en 100 μ l de volumen final de células, las cuales se resuspendieron en un tampón de unión a Anexina. Se dejó incubando en hielo y en oscuridad durante 15 minutos y se procedió a su análisis por citometría de flujo. Como controles positivos empleamos células tratadas con staurosporina, estímulo apoptótico, 2,5 μ M durante 2 horas.

En cuanto al análisis de la apoptosis celular en tratamientos con LPS, se trataron los macrófagos peritoneales con LPS (1 μ g/ml) durante 24 horas y posteriormente se siguió el protocolo de Anexina V PE-7-AAD anteriormente descrito.

2.7. Adhesión *in vivo* a membrana peritoneal.

La capacidad de adhesión de los macrófagos peritoneales se analizó mediante ensayos de adhesión *in vivo* a la membrana peritoneal del ratón (Figura F). En primer lugar obtuvimos células de la cavidad peritoneal, de ratones silvestres (*cox-2^{+/+}*) y *cox-2^{-/-}* (donadores), al 4º día de la inyección i.p. de 1ml de tioglicolato. Las células obtenidas de ambos ratones fueron marcadas con 5 μ M del marcador PKH-26 PLC (028K0462 de Sigma) durante 10 minutos. Se paró la reacción con SFB y se realizaron 2 lavados con PBS al 10% SFB. Después se inocularon 4×10^6 de células, procedentes de ratones silvestres y *cox-2^{-/-}* marcados previamente y resuspendidas en 1ml de PBS, en la cavidad peritoneal de los ratones silvestres (receptores). Tras 30 minutos, estimulamos los macrófagos inyectados con 1 μ g/ml de LPS. Pasados 5 minutos extrajimos la membrana peritoneal y se lavó varias veces con PBS frío de la cavidad peritoneal. Las muestras de la membrana peritoneal se incluyeron en 2% de formalina en PBS, se montaron en cubreobjeto para ser analizadas posteriormente por microscopía (cámara CCD color Zeiss) las células PKH26⁺ adheridas a la misma. A su vez analizamos mediante citometría las células PKH26⁺ procedentes de los lavados de la cavidad peritoneal.

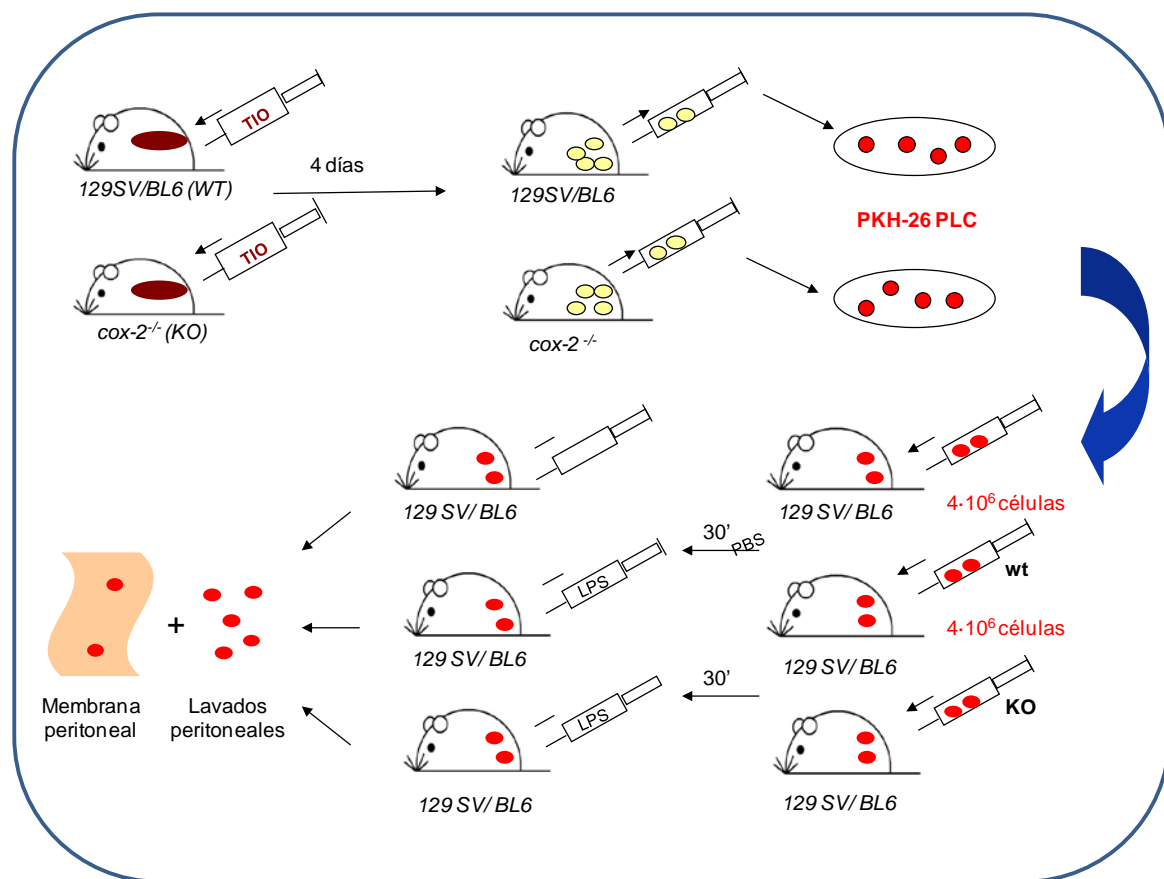


Figura F: Ensayo de adhesión *in vivo*

2.8. Migración celular mediante “transwell”.

2×10^5 macrófagos peritoneales de ratones silvestres o *cox-2*^{-/-} se cultivaron en placas de cultivo permeables “Trans-well” (Corning Inc.) con membranas de un diámetro de poro de 8 μm durante al menos 3 horas en medio RPMI con 2% SFB. Después se analizó la capacidad de migración de los macrófagos en respuesta a RPMI al 2% SFB, a RPMI al 5% o a RPMI al 5% SFB más 1 y 10 ng/ml de quimioquinas específicas MCP-1, RANTES y MIP-1 α (479-JE, 478-MR y 450-MA respectivamente de R&D Systems) dispuestas en la parte inferior de la placa “Transwell”. La migración se mantuvo durante 24 horas. A continuación se lavaron suavemente dos veces con PBS, para eliminar aquellas células que no han atravesado la membrana del “transwell”. Posteriormente se fijaron las células con 5% de glutaraldehído (tipo II, Sigma G-6257) en PBS durante 20 minutos. Se volvió a lavar de la misma forma y se procedió a la tinción con 0,5% cristal violeta (Sigma C-6158) en agua-50% metanol durante 20 minutos. Después se lavaron los pocillos “transwell” con PBS y por último en agua. Se tomaron fotos de 8 campos

distintos por punto con una cámara CCD (Leica), ampliadas 200 x, para la cuantificación del número de macrófagos que migraban en respuesta a las diferentes quimioquinas.

Para analizar el papel de las prostaglandinas en migración, tratamos a los macrófagos con las prostaglandinas, PGE₂ (2 µM) y PGF_{2α} (2 µM) en la parte superior de la membrana y las distintas quimioquinas, colocadas en la parte inferior de la membrana “transwell”. Pasadas las 24 horas se siguió el protocolo de migración descrito anteriormente.

Los experimentos fueron realizados por duplicado y los datos representados como Migración relativa (Nº de células de la muestra / Nº de células del control).

2.9. Migración *in vivo* a nódulos linfáticos.

Los macrófagos peritoneales obtenidos de ratones silvestres y *cox-2*^{-/-}, después del 4º día tras la inyección de 1ml de tioglicolato fueron marcados con 5µM de PKH-26 PLC durante 10 minutos. 4x10⁶ de las células marcadas de ambos ratones de estudio, fueron transferidas a la cavidad peritoneal de ratones silvestres receptores. Transcurrido 30 minutos, se estimularon los macrófagos inoculados con 1µg/ml de LPS. Pasadas 4 horas se realizaron lavados de la cavidad peritoneal con PBS frío y se procedió a la extracción de los nódulos linfáticos poplíteos, inguinales, axilares, los cuales se incluyeron en Tissue-tek para congelarlos.

Se realizaron marcajes de diferentes proteínas extracelulares, como F4/80, CD11c y CD11b asociados a diferentes fluorocromos, de las células obtenidas de los lavados de la cavidad peritoneal (protocolo descrito anteriormente) y se analizaron por citometría de flujo las células doblemente positivas para PKH26 como de los otros marcadores empleados. A su vez se analizaron las células PKH26⁺ en los cortes realizados de 5µm de los nódulos linfáticos por microscopia de fluorescencia, cámara CCD color (Zeiss).

2.10. Adhesión *in vitro*.

La capacidad de adhesión de macrófagos *cox-2*^{-/-} se analizó mediante ensayos de adhesión en placas de cultivo p96 que se recubrían con 2 µg/ml de Fibronectina (F1141 de Sigma) o con 1 µg/ml de ICAM-1 (Recombinant Mouse ICAM-1/CD54 Fc Chimera 796-IC de R&D Systems) en PBS, durante un periodo de 18 horas a 4°C. Posteriormente,

se retiró el sustrato no unido y se bloquearon las placas con solución de bloqueo (1% BSA desnaturalizado a 85°C durante 10-12 minutos en PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron varios lavados con solución de lavado (BSA 0,1% en PBS). Para las adhesiones realizadas a fibronectina se plaquearon 2×10^5 macrófagos peritoneales resuspendidos en medio de adhesión específico (20mM Hepes pH7.4, 149mM de NaCl, 2mg/ml glucosa, 1mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 y 0,1% BSA) por punto. Las células del control positivo se resuspendieron en 0,1% BSA en PBS-1mM de MnCl_2 . Se dejaron sedimentar las células en hielo durante 10 minutos y la adhesión celular se realizó en el incubador durante 20 minutos. Posteriormente, se eliminaron las células no adheridas mediante tres lavados con solución de lavado. Las células que permanecieron adheridas fueron fijadas con PBS, 4% formaldehído, y se tiñeron con Cristal Violeta al 0,5% en agua-50% metanol durante 20 minutos. Se lavó la placa por inmersión en agua de grifo y se solubilizó el colorante adquirido por las células mediante 10% de ácido acético durante 5 minutos a temperatura ambiente. La cuantificación de las muestras se realizó mediante la lectura de la absorbancia del Cristal Violeta a 562 nm. En los experimentos de adhesión, las muestras se ensayaron por cuadruplicado y los resultados se representan como la $\text{DO}_{562}/\text{control positivo} \times 100$ (% de adhesión).

Las adhesiones a ICAM-1 se realizaron marcando previamente las células con la sonda BCECF AM (0,1 μg , Invitrogen) durante 30 minutos. Se lavó dos veces con solución de lavado y se resuspendieron las células en medio adhesión anteriormente descrito. Tras dejar sedimentar las células en hielo durante 10 minutos, se permitió su adhesión durante 20 minutos en el incubador. Posteriormente se leyó la placa a 485nm de fluorescencia de excitación-520nm de fluorescencia de emisión, en el FLUOstar Optima (BMG Labtech), para obtener el número total de células. Tras tres lavados con PBS para eliminar las células no adheridas, se realizó una última lectura. Los resultados representan la media de fluorescencia de cada muestra/fluorescencia total $\times 100$ (% de adhesión a ICAM-1).

En cuanto al efecto de las prostaglandinas, LPS e inhibidores de COX-2, en la adhesión de los macrófagos peritoneales, se trataron las células, una vez extraídas de la cavidad peritoneal, con diferentes concentraciones de prostaglandina y LPS durante 24 horas. Los diferentes inhibidores de COX-2, se añadieron 1 hora antes de cualquier tratamiento posterior. Después se procedió a la realización del ensayo de adhesión anteriormente descrito.

2.11. Cuantificación de nitritos.

El óxido nítrico (NO) es una molécula muy inestable y tóxica que es rápidamente convertida por las células en metabolitos más estables y menos perjudiciales para ellas mismas, como son los nitritos (NO_2^-) y los nitratos (NO_3^-), los cuales son productos de la degradación oxidativa de los reactivos intermediarios del nitrógeno. Para determinar la producción de NO se utiliza, una medida indirecta en la que se determina la acumulación de nitritos (NO_2^-) en los sobrenadantes de células en cultivo. Este método se denomina ensayo de Griess.

Una vez extraídos los macrófagos peritoneales se cultivaron 5×10^5 células en una p24 en RPMI 2% SFB. Se mantuvieron en cultivo durante varias horas para después lavar con PBS y eliminar así las células no adherentes. A continuación estimulamos con LPS ($1 \mu\text{g/ml}$), $\text{INF}\gamma$ (100 unidades/ml) y LPS+ $\text{INF}\gamma$ ($1 \mu\text{g/ml}$ y 50 unidades/ml respectivamente) en RPMI 2% SFB durante 48 horas. Recogimos el sobrenadante de las células para medir la concentración de nitritos y extrajimos proteína para analizar mediante western blot la expresión de iNOS.

Para analizar los niveles de nitritos, preparamos una solución stock de NO_2Na 5mM, a partir de la cual realizamos diluciones seriadas para realizar una recta patrón con un rango de 1 a $500 \mu\text{M}$. De los sobrenadantes obtenidos anteriormente, mezclamos $100 \mu\text{l}$ del sobrenadante con $100 \mu\text{l}$ de reactivo de Griess (solución de 0,1% de dihidrocloruro de naftil-etilen-diamina diluido en agua, y 1% de sulfanilamida diluida en 5% H_3PO_4 mezclados en una reacción 1:1 v/v) y dejamos incubando la mezcla 15 minutos en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación se mide la absorbancia a 540nm y se interpolan los valores obtenidos de densidad óptica (O.D.) con la recta patrón realizada con la solución de NO_2Na para determinar la concentración de nitritos en los sobrenadantes.

2.12. Análisis de la activación de GTPasas.

Para el análisis de la activación de Rac y Cdc42, se empleó una proteína de unión a GST que contiene el dominio de unión p21 (PBD) de la quinasa de activación-p21 (Pak) de Rac y Cdc42 (PAK-1 PBD, agarose conjugate, Millipore 14-325).

En primer lugar, se cubrieron las placas p100 con $2 \mu\text{g/ml}$ de fibronectina en PBS, durante toda la noche. Se retiró el sustrato no unido y se bloquearon las placas con 1% de

BSA desnaturalizado en PBS durante 2 horas. Se plaquearon entre $8-10 \times 10^6$ de macrófagos peritoneales resuspendidos en RPMI al 2% SFB más 10 ng/ml de la quimioquina Rantes y se dejaron 2 horas a 37°C . Se lisaron las células con 1 ml de buffer de lisis celular 1x en agua miliQ más un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche). Los lisados celulares fueron inmediatamente centrifugados a $10.000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C . La concentración de los extractos totales de proteína presentes en el sobrenadante fueron determinados mediante BCA (PIERCE). Una parte de las muestras lisadas se utilizó para la cuantificación de proteína total. La misma concentración de proteína, tanto de los macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ como de los $\text{cox-2}^{-/-}$, fue incubada con las bolas de agarosa PAK-1 PBD (10 μg) durante 1 hora a 4°C en agitación. Posteriormente las bolas fueron lavadas 3 veces con el buffer de lisis descrito y la proteína unida fue diluida con buffer de muestra Laemmli. Rac y Cdc42 fueron detectadas por Western Blot usando específicos anticuerpos (anti-Cdc42 de Santa Cruz Biotechnology; anti-Rac1 [clone 23A8] de Millipore).

2.13. Medición de prostaglandina (PGE₂) y citoquinas.

La cuantificación de la producción de PGE₂ y citoquinas, se realizó a partir de sobrenadantes recogidos de macrófagos peritoneales cultivados *in vitro*. La medición de prostaglandina se realizó mediante inmuno-ensayos competitivos “PG EIA kit” (Cayman Chemical), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes de macrófagos también fueron utilizados para medir producción de citoquinas (IL-12 p70, IL-6 y MCP-1), mediante Elisa (R&D Systems).

2.14. Reclutamiento leucocitario en la cavidad peritoneal de ratones $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ y efecto de la administración intraperitoneal de las prostaglandinas PGE₂ y PGF_{2 α} .

Se realizaron inyecciones i.p. de LPS (25 mg/kilogramo de animal) diluido en 1 ml de PBS, para inducir una respuesta inflamatoria. Pasadas 3h se procedió a la inyección i.p. de PGE₂ (5 μM) y PGF_{2 α} (5 μM) en PBS. 3 horas más tarde se sacrificaron a los animales y se realizaron lavados peritoneales con PBS frío. Las células recuperadas de la cavidad peritoneal fueron marcadas con el anticuerpo CD11b marcado con alexa 647. Se analizaron por citometría de flujo el porcentaje de células CD11b⁺. Los resultados se muestran relativizados al control solo con PBS.

2.15. Presentación antigénica.

Para el ensayo de presentación antigénica empleamos los ratones $\text{cox-2}^{+/+}$, $\text{cox-2}^{-/-}$ y los ratones OTII, todos compatibles a nivel del haplotipo del MHC. Se extrajeron de los ratones $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ los macrófagos peritoneales. Se sembraron 70.000 macrófagos por punto en una placa p96 de fondo plano y se cargaron durante toda la noche con diferentes concentraciones del péptido de OVA (323-339) y diferentes concentraciones de la proteína de ovoalbúmina. Por otro lado se extrajeron de los ratones OTII los nódulos linfáticos, y una vez disgregados los mismos se marcaron las células T con la sonda CellTrace Violet (Invitrogen) a una concentración de $2,5 \mu\text{M}$, entre $5-10 \times 10^6$ células en 2 ml de PBS, durante 20 minutos a 37°C . Una vez marcadas se resuspendieron en RPMI 10% SFB y se co-cultivaron 200.000 células T con los macrófagos peritoneales del día anterior. Tras 24 horas de co-cultivo se procedió al análisis de la activación de los linfocitos T por citometría, marcando las células con los anticuerpos anti-CD25 y anti-CD69, y seleccionando la población con CD4. Al tercer día del co-cultivo se analizó la proliferación de las células T por citometría de flujo marcando las células con anti-CD4. Los resultados se muestran como índice de proliferación = n° de divisiones ($\%$ de células en cada pico de proliferación \times n° división/ tanto por uno de las células que no se han dividido)

2.16. Aislamiento de células CD11b y CD11c de los lavados peritoneales.

De los macrófagos extraídos de la cavidad peritoneal fueron seleccionadas las células CD11b^+ y CD11c^+ mediante el aislamiento magnético empleando bolas magnéticas y columnas LS MACS (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las poblaciones seleccionadas CD11b^+ y CD11c^+ , fueron marcadas con el anticuerpo F4/80 conjugado con ficoeritrina (PE) y analizadas por citometría, obteniendo una pureza de células CD11b^+ y CD11c^+ del 95-99%.

2.17. Tinción de faloidina por citometría.

Una vez extraídos los macrófagos peritoneales, se estimularon durante 24 horas con PGE₂ (2 µM). Posteriormente se fijaron las células con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos. Se lavaron y se permeabilizaron con tritón X100 durante 2-4 minutos. Se marcaron con faloidina (dilución 1:500 en PBS) de Sigma durante 40 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Tras lavar varias veces con PBS, se analizaron las muestras en el citómetro de flujo.

2.18. Análisis Estadístico.

Los datos fueron analizados usando el software Prism (Graph pad, Inc, Version 5.0). En poblaciones múltiples con diferentes medias se analizó la varianza de las mismas mediante el test de Anova de 1 rama y se compararon las medias mediante el test de Bonferroni. Además, se realizó el test t-student para comparar dos poblaciones entre sí. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

1. Caracterización celular durante la respuesta inflamatoria inducida por tioglicolato.

Como se ha mencionado en la introducción, la ausencia de Cox-2, así como su inhibición por las AINEs, implica una menor respuesta inflamatoria. Es decir Cox-2 juega un papel importante en enfermedades de naturaleza inflamatoria siendo una molécula clave en la respuesta inmune. Uno de los objetivos de este trabajo ha sido estudiar como la ausencia de Cox-2 afecta a la respuesta de diferentes células del sistema inmune en respuesta a un estímulo inflamatorio.

1.1. Análisis de las poblaciones celulares infiltradas en el foco inflamatorio.

En primer lugar se llevo a cabo un estudio de las poblaciones de células del sistema inmune que migran al peritoneo durante la peritonitis inflamatoria. El protocolo llevado a cabo consistió en inducir una peritonitis a los ratones control (cox-2^{+/+}) y a los ratones cox-2^{-/-} tras haberles inyectado 1 ml de tioglicolato (10% p/v) intraperitonealmente (i.p.). Tras 4 días se procedió a realizar lavados con PBS frío de la cavidad peritoneal, extrayendo así las poblaciones celulares que se acumulan en la misma cavidad y analizándolas mediante citometría de flujo.

En primer lugar se evaluó el número total de células extraídas del peritoneo tanto en ratones control cox-2^{+/+} como en ratones cox-2^{-/-} (Figura 1A). Observamos que hay un descenso significativo en el número total de células que migran en ratones cox-2^{-/-} en comparación con los ratones cox-2^{+/+}. Con el objetivo de determinar que poblaciones celulares se acumulan menos en el foco inflamatorio (Figura 1B), marcamos por un lado las células linfoides T y B con los anticuerpos anti-CD3e y anti-CD45R/B220, respectivamente, sin observar diferencias significativas en el número de células CD3e⁺ y B220⁺ entre los ratones cox-2^{+/+} y cox-2^{-/-}. Por otro lado el estudio de las poblaciones mieloides se realizó analizando la expresión de F4/80, CD11b y CD11c. El número de células positivas para cada uno de estos marcadores que se aislaron de la cavidad peritoneal de ratones cox-2^{+/+}, fue significativamente mayor en comparación con las aisladas de ratones cox-2^{-/-}. Por último analizamos también las poblaciones de neutrófilos y células NK mediante el uso de los anticuerpos específicos GR1 y NK1.1, respectivamente, sin encontrar diferencias significativas en cuanto al número de células positivas para ambos marcadores en ratones cox-2^{+/+} y cox-2^{-/-}. En conclusión

observamos que hay un menor número de células que migran al peritoneo en respuesta a tioglicolato en los ratones *cox-2*^{-/-}, y por otro lado, tal reducción sólo se da en aquellas células de naturaleza mieloide F4/80, CD11b y CD11c.

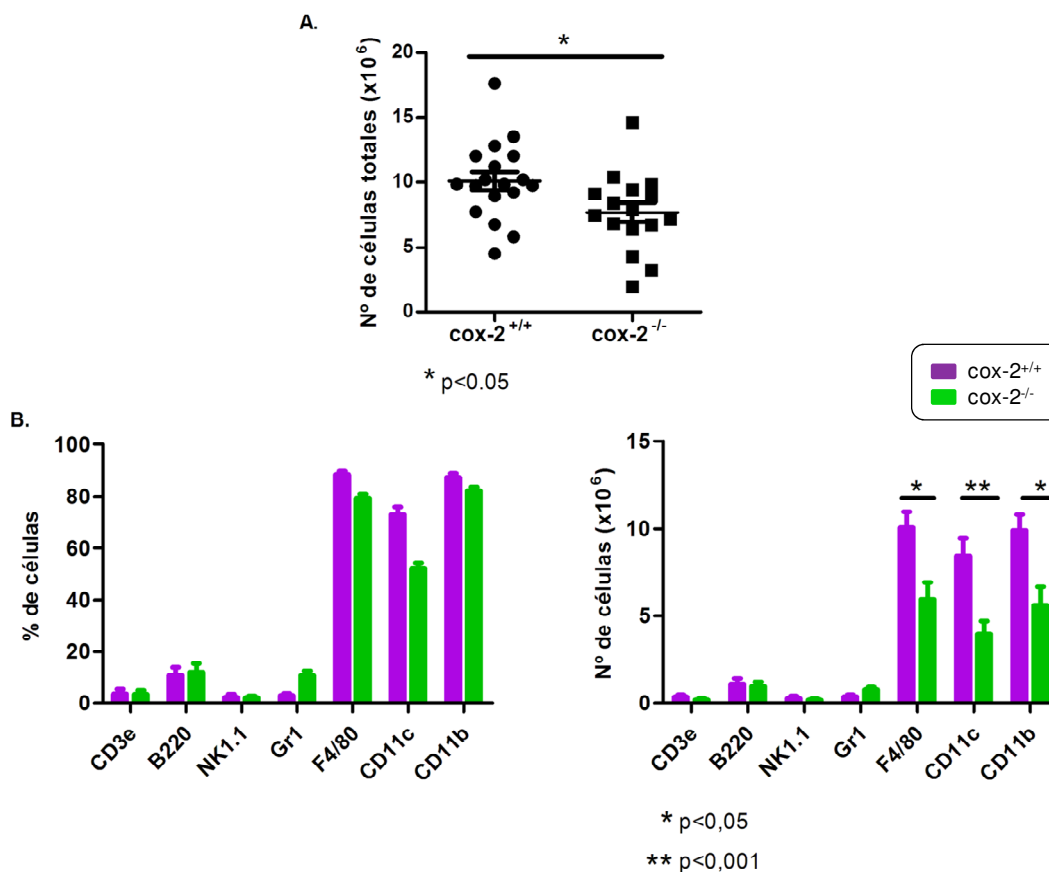


Figura 1. Los ratones *cox-2*^{-/-} presentan una menor acumulación de células mieloides en la cavidad peritoneal.

(A) Número de células totales que migran a la cavidad peritoneal en respuesta a tioglicolato sódico (10% p/v) de ratones *cox-2*^{+/+} (n=18) y *cox-2*^{-/-} (n=16). Datos expresados como la media \pm SD, t-student. (B) Análisis de las poblaciones inmunes celulares presentes en el peritoneo de ratones *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-} tras el tratamiento con tioglicolato. Datos analizados por citometría de flujo mediante el empleo de anticuerpos específicos y expresados en porcentaje de células positivas para los diferentes marcadores, y número de células positivas totales de cada marcador. Datos expresados como la media \pm SEM, test de Mann Whitney (n=9 ratones por grupo).

1.2. Fenotipo de las células mieloides peritoneales.

Las células del linaje mieloide son consideradas un tipo celular muy heterogéneo dependiendo tanto del estado de diferenciación y activación, como del lugar y distribución en el tejido. En la cavidad peritoneal del ratón selectivamente se atrae y

mantienen células inmunes especializadas, incluyendo en su mayoría, y como hemos observado anteriormente, los macrófagos peritoneales. Mediante citometría de flujo decidimos analizar los marcadores típicos de macrófagos que se expresan extracelularmente, CD11b, F4/80 y CD11c en los lavados peritoneales obtenidos de los ratones $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ (Figura 2). Los resultados muestran en primer lugar más de un 90% de una población bastante homogénea de células CD11b^+ . A su vez también presentan una alta expresión de F4/80, mientras que encontramos una reducción en la expresión en membrana de CD11c en los ratones $\text{cox-2}^{-/-}$, de la que hablaremos posteriormente en el apartado 2.

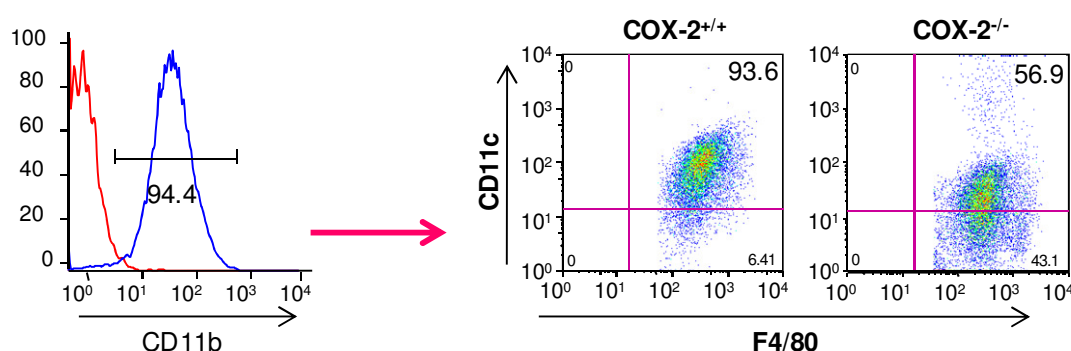


Figura 2. Fenotipo de las células mieloides peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ inducidos por tioglicolato.

Análisis mediante citometría de flujo de la expresión extracelular de CD11c y F4/80 en macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ CD11b^+ .

Existen muchos tipos celulares de procedencia mieloide que comparten marcadores de membrana característicos. Un caso particular son las células dendríticas que al igual que los macrófagos son tanto CD11c^+ , CD11b^+ como F4/80^+ , aunque en el caso de estos dos últimos con una menor expresión comparado con los macrófagos (Ghosn et al., 2009). Para confirmar que las células mieloides que obtenemos de los lavados peritoneales tras inducir una peritonitis con tioglicolato son realmente macrófagos y no células dendríticas, decidimos aislar del lavado peritoneal por un lado las células CD11b^+ y por otro las células CD11c^+ , mediante el empleo de bolas magnéticas (Figura 3). Una vez aisladas por un lado la población celular simple positiva para CD11b como por otro la población celular para CD11c , marcamos ambas poblaciones con F4/80 y mediante citometría de flujo (Figura 3.A) podemos observar que ambas poblaciones CD11b^+ como CD11c^+ son igualmente positivas para F4/80.

Está descrito que las células dendríticas maduras presentan una expresión elevada de MHCII a diferencia de los macrófagos, que se incrementa en respuesta a LPS (Brandt et al., 2003; Kamon et al., 2006; Stables et al. 2011). Analizando mediante citometría la expresión en membrana de MHCII en las células obtenidas de los lavados peritoneales de ratones *cox-2^{+/+}* y estimuladas con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 horas (Figura 3.B), determinamos que además de presentar una baja expresión tampoco se ve incrementada con tratamientos con LPS. También podemos observar en las mismas células (Figura 3.C) la ausencia de expresión del receptor CCR7, clave para la migración de las células dendríticas desde el foco inflamatorio hacia los nódulos linfáticos (Forster et al., 2008).

Por lo tanto podemos concluir que la población obtenida en los lavados peritoneales tras inducir una peritonitis está compuesto mayoritariamente de macrófagos peritoneales CD11b^+ , F4/80^+ y CD11c^+ .

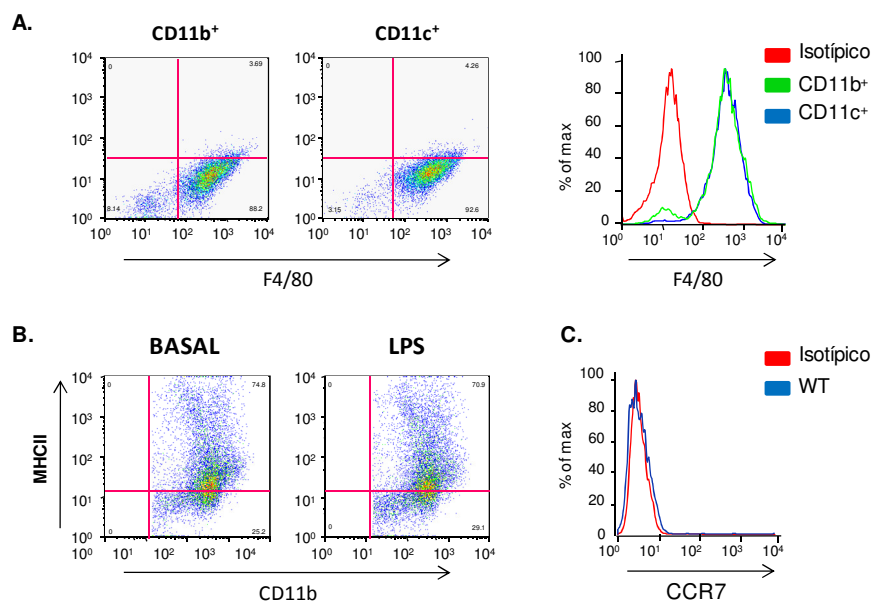


Figura 3. Estudio comparativo de las células mieloides CD11b^+ vs CD11c^+ peritoneales.

(A) Análisis mediante citometría de flujo de la expresión extracelular de F4/80 en células aisladas CD11b^+ y CD11c^+ mediante el uso de bolas magnética y procedentes de los lavados peritoneales tras inducir una peritonitis con tioglicolato. (B) Análisis de la expresión de MHCII en células *cox-2^{+/+}* procedentes de los lavados peritoneales y estimuladas con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 h. (C) Análisis del receptor CCR7 en células aisladas de la cavidad peritoneal tras realizar lavados con PBS frío.

1.3. Análisis morfológico de las células adherente peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$.

Decidimos analizar la morfología de las células obtenidas de la cavidad peritoneal tras la inducción con tioglicolato. Para ello realizamos lavados peritoneales con PBS frío los días 1, 2, 3 y 4 tras la inyección i.p. de tioglicolato (Figura 4). Mediante microscopía confocal estudiamos el citoesqueleto de actina de las células aisladas tanto de ratones $\text{cox-2}^{+/+}$ como de los ratones $\text{cox-2}^{-/-}$, las cuales se adhirieron a cubreobjetos durante 20 minutos (Figura 4.A). Como muestran las imágenes, en el día 1 de acción del tioglicolato apenas hay células adherentes, pero ya a partir del 2º día empiezan a encontrarse células adherentes de mayor complejidad. Cabe destacar que son células capaces de formar estructuras complejas como filopodios y lamelipodios que determinan su maduración hacia fenotipos característicos de macrófagos (Pelegrin & Surprenant, 2009). A simple vista podemos ver que los macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$ presentan un tamaño relativo menor y de morfología menos compleja (menos extendida). Cuantificando mediante imagen J el área celular (Figura 4.B) determinamos que a partir del 3º día los macrófagos deficientes en Cox-2 presentan un tamaño significativamente menor en comparación con los $\text{cox-2}^{+/+}$, y como se observa en la Figura 4.C analizando la expresión de anexinaV/7AAD por citometría de flujo, esa diferencia no se debe a que las células $\text{cox-2}^{-/-}$ sufran más daño celular tras tratamientos con el tioglicolato.

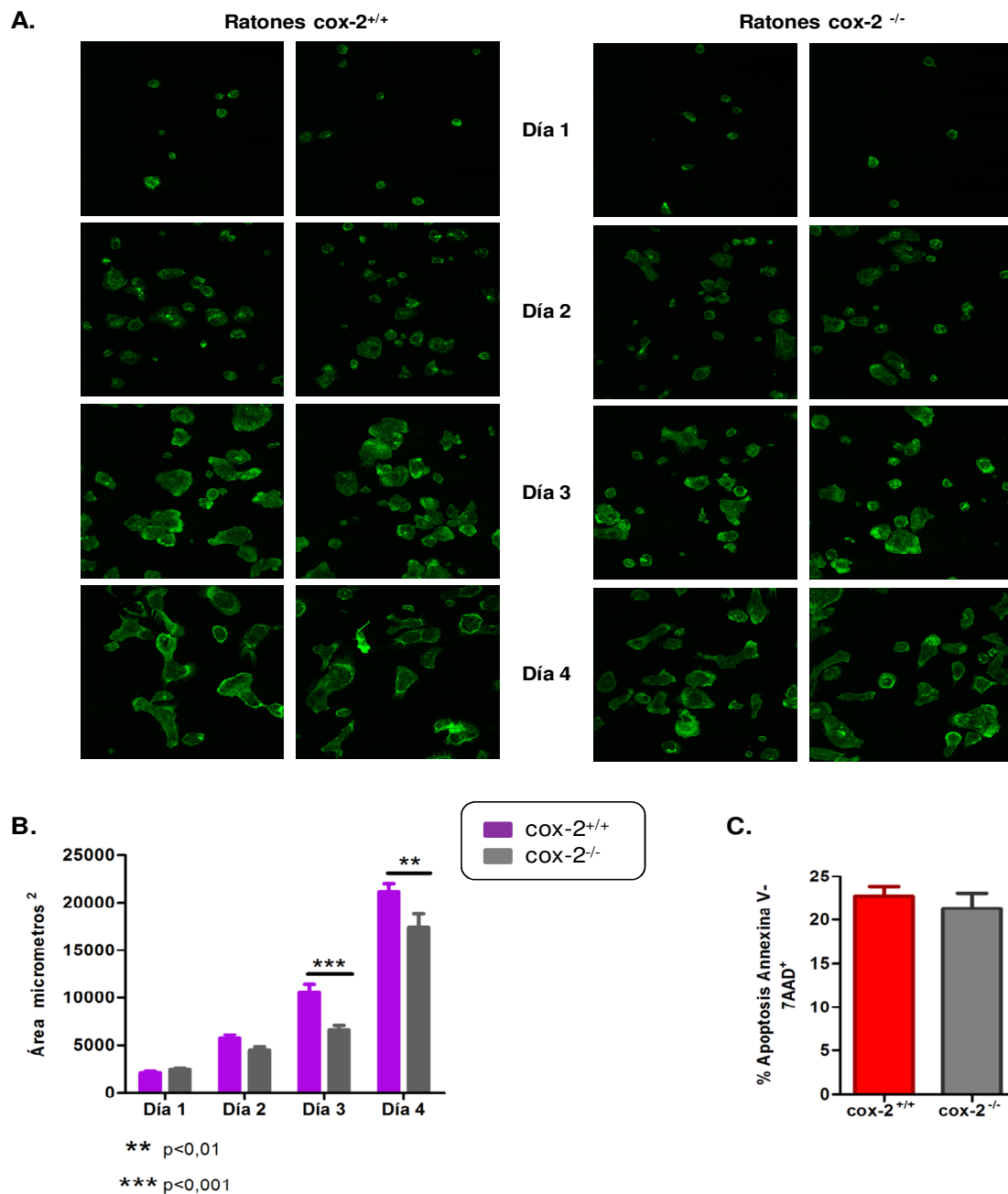


Figura 4. Análisis morfológico de las células adherentes procedente de la cavidad peritoneal durante los 4 días de acción del tioglicolato.

(A) Estructura del citoesqueleto de actina de las células mieloides *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-}. Las células peritoneales fueron adheridas a cubreobjetos durante 20 minutos. Se marcó la actina con faloidina acopaplado a alexa 488. Imágenes tomadas por Confocal Radiance 2000 a una magnitud de 65x. (B) Cuantificación del área celular (μm²) durante los 4 días de acción del tioglicolato mediante el programa de análisis de imágenes Image J. Datos expresados como media ± SD, test de Anova (n=9 ratones por grupo y 8 campos analizados por muestra de ratón). (C) Tinción celular con Anexina V y 7-AAD de los macrófagos peritoneales *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-} tras su obtención desde la cavidad peritoneal. Datos analizados por citometría de flujo y expresados como la media ± SD del porcentaje de células anexina V⁺/7-AAD⁺, t-student (n=8 animales de cada grupo).

2. Implicación de Cox-2 en el proceso de diferenciación y maduración de los macrófagos.

La diferenciación de los monocitos está asociada con la inducción de la expresión de CD11c. La unión de CD11c con su ligando da como resultado la firme adhesión de los monocitos al endotelio vascular, la migración transendotelial, la quimiotaxis y la fagocitosis (Shelley et al., 2002). Los resultados anteriormente obtenidos en cuanto a una menor expresión de CD11c como a un tamaño relativo menor, sugieren que la deficiencia en Cox-2 estuviese relacionada con una alteración en los procesos de diferenciación-maduración de los macrófagos.

2.1. Estudio de la expresión de CD11c durante el proceso de maduración de los macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$.

Debido a que CD11c se expresa menos en ausencia de Cox-2 decidimos estudiar si tal disminución se da también a lo largo del proceso de maduración de monocito-macrófago. Para ello estudiamos la expresión de CD11c en células CD11b^+ extraídas durante los distintos días de acción del tioglicolato (Figura 5). Los resultados obtenidos por citometría de flujo (Figura 5.A y 5.B) muestran una reducción significativa en el % de células $\text{CD11c}^+/\text{CD11b}^+$ en células deficientes en Cox-2 desde los primeros días de la inducción de peritonitis por tioglicolato. También se observa que la reducción en ratones $\text{cox-2}^{-/-}$ de CD11c, se produce a su vez en los niveles de proteína total (Figura 5.C). Por tanto el incremento en los niveles de CD11c observados en los macrófagos a lo largo de la evolución de la peritonitis inducida por tioglicolato, sugiere un papel importante de CD11c a lo largo de la maduración de monocito-macrófago que en caso de los macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$ se encuentra significativamente reducida.

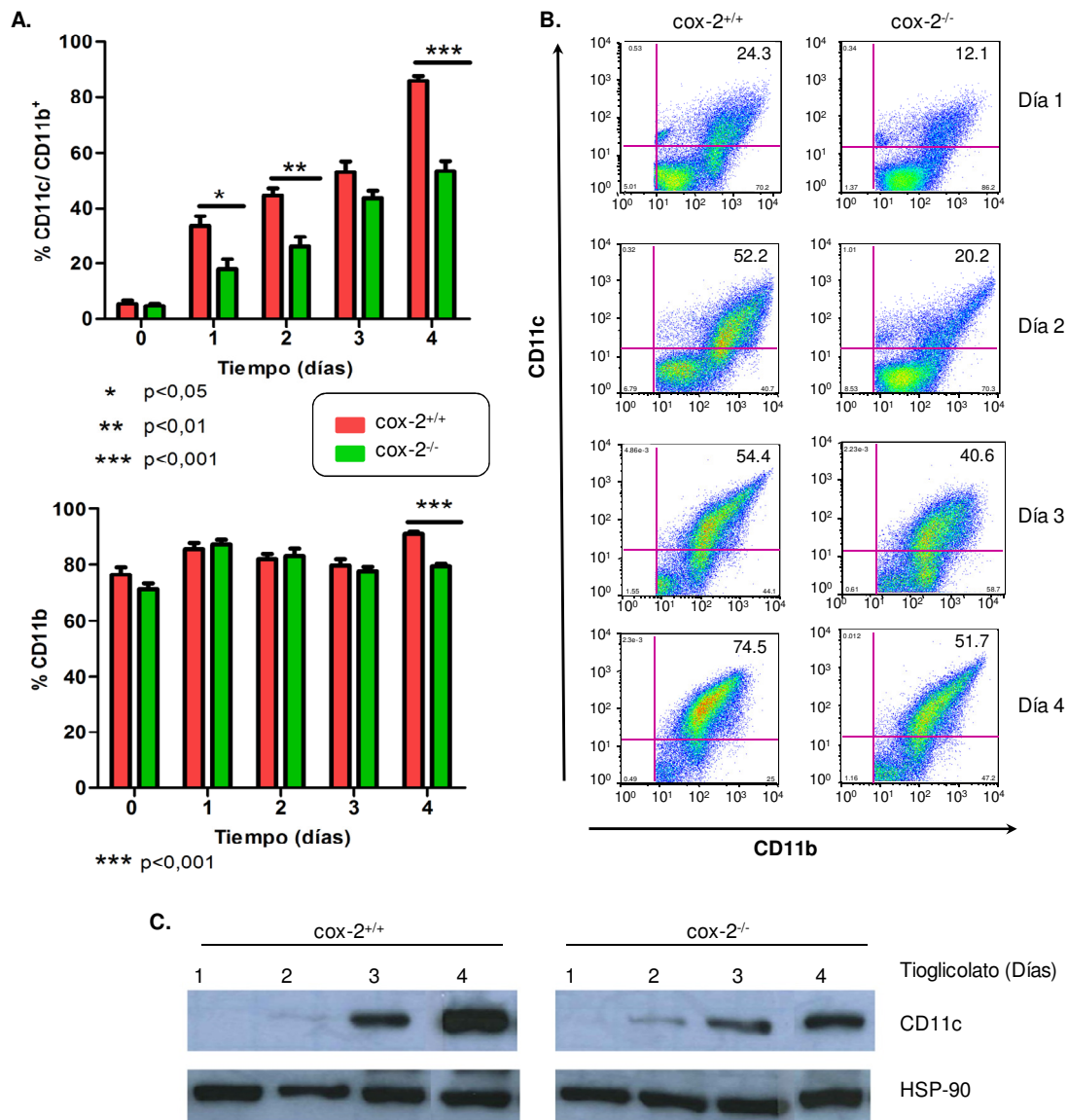


Figura 5. Los ratones *cox-2*^{-/-} presentan una menor expresión de CD11c durante el proceso de maduración monocito-macrófago.

(A) Análisis de células inmunes CD11b⁺ y CD11c⁺ presentes en la cavidad peritoneal tras los distintos días de tratamiento con tioglicolato en ratones *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-}. Los datos se obtuvieron mediante citometría de flujo y son expresados como la media del porcentaje de células positivas para los diferentes marcadores \pm SEM, test de Anova (n=8 animales por grupo y día). (B) Expresión de CD11c en membrana de macrófagos peritoneales CD11b⁺ de ratones *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-} tras los distintos días de tratamiento con tioglicolato, analizadas por citometría de flujo. (C) Inducción de la expresión de CD11c en células mieloides *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-}, por el tratamiento con tioglicolato, analizada por Western Blot.

Como hemos descrito anteriormente los ratones deficientes en Cox-2 presentan una menor expresión de CD11c. Para ello profundizamos en el análisis de su expresión tanto en membrana, mediante citometría de flujo, como la proteína total (Western Blot) (Figura 6). Como se muestra en la Figura 6.A los macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{-/-}$ presentan una reducción significativa en cuanto a la expresión de la media, mediana de fluorescencia y porcentaje de células CD11c^{+} . Por otro lado como muestra la Figura 6.B la ausencia de la actividad de Cox-2 disminuye los niveles de proteína total, tanto en muestras $\text{cox-2}^{+/+}$ tratadas con los inhibidores de Cox-2, Celecoxib (Cele), como NS398, como también en los macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$.

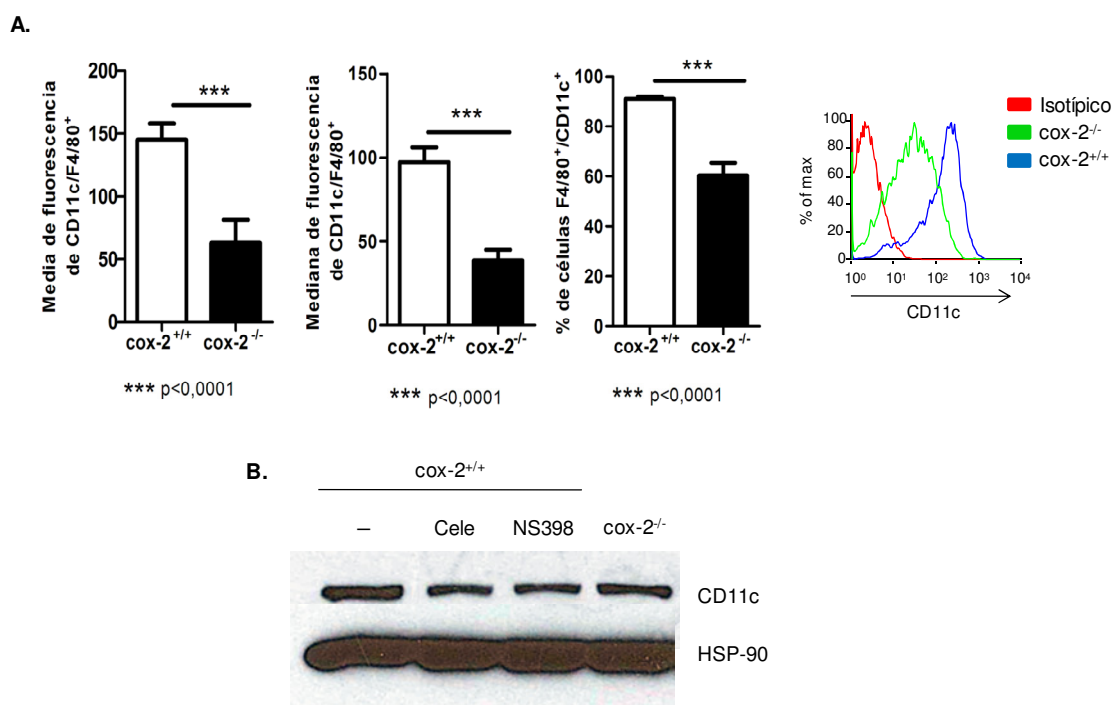


Figura 6. La ausencia de Cox-2 disminuye la expresión de CD11c en los macrófagos peritoneales.

(A) Cuantificación de la media de fluorescencia, mediana de fluorescencia y porcentaje de células $\text{CD11c}^{+}/\text{F4/80}^{+}$ de macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ analizado por citometría de flujo. Los datos son expresados como la media \pm SEM, t-Student ($n=12$ animales por grupo). (B) Análisis por inmunotransferencia de la expresión de CD11c de macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$. Los macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ fueron tratados con inhibidores de Cox-2 (1 μM) durante 18 h.

2.2. Expresión del receptor de GM-CSF en macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$.

Los monocitos de sangre periférica expresan CD11c y CD11b para mediar la adhesión al endotelio tras la estimulación con GM-CSF (Georgakopoulos et al., 2008). Por ello analizamos los niveles del receptor de GM-CSF.

Estudiamos mediante citometría la expresión en membrana del receptor de GM-CSF en macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ (Figura 7.A). Los resultados muestran una reducción significativa en la media, mediana de fluorescencia y en el % de células GM-CSFR⁺/F4/80⁺ en macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$ en comparación con los $\text{cox-2}^{+/+}$. Además tratamientos con Celecoxib en los macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{-/-}$ también producen una disminución de la expresión del receptor de GM-CSF (Figura 7.B). Este resultado podría explicar la disminución de CD11c dada que la señalización a través del GM-CSF sería menor en los macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$.

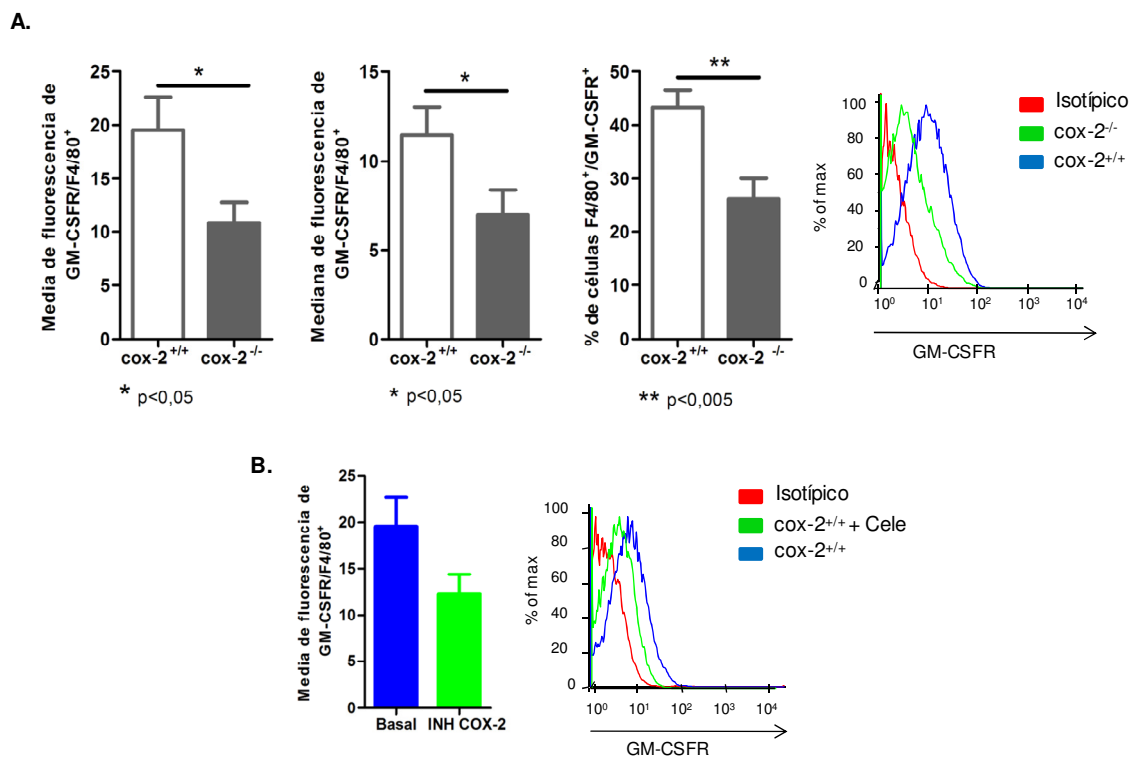


Figura 7. Los macrófagos deficientes en Cox-2 presentan una menor expresión en membrana del receptor de GM-CSF.

(A) Cuantificación de la media de fluorescencia, mediana de fluorescencia y porcentaje de células positiva del receptor de GM-CSF, de macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$, F4/80⁺, analizado por citometría de flujo. Los datos son expresados como la media \pm SEM, t-Student (n=12 animales por grupo). (B) Analisis mediante citometría de flujo de la expresión del receptor de GM-CSF en macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ tratados con celecoxib (0,1 μM) durante 24 h.

2.3. Estudio del proceso de diferenciación de macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ derivados de médula ósea.

Los resultados anteriores sugieren un defecto en la maduración de los macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$. Por ello decidimos analizar si tal defecto se debe a una diferenciación alterada a partir de células de la médula ósea. Para ello aislamos las células de la médula ósea de ratones $\text{cox-2}^{+/+}$ y de ratones $\text{cox-2}^{-/-}$ y las cultivamos durante 7 días con medio completo en presencia de un 10% del sobrenadante de las células L929 (LCM) que presenta M-CSF necesario para su diferenciación. A continuación realizamos un estudio mediante citometría de diferentes marcadores de diferenciación como F4/80, Ly6C y CD16/ CD32 durante los días 1, 3, 5 y 7. Según muestra la [Figura 8](#) no encontramos diferencias significativas durante el proceso de diferenciación entre ratones $\text{cox-2}^{+/+}$ y ratones $\text{cox-2}^{-/-}$.

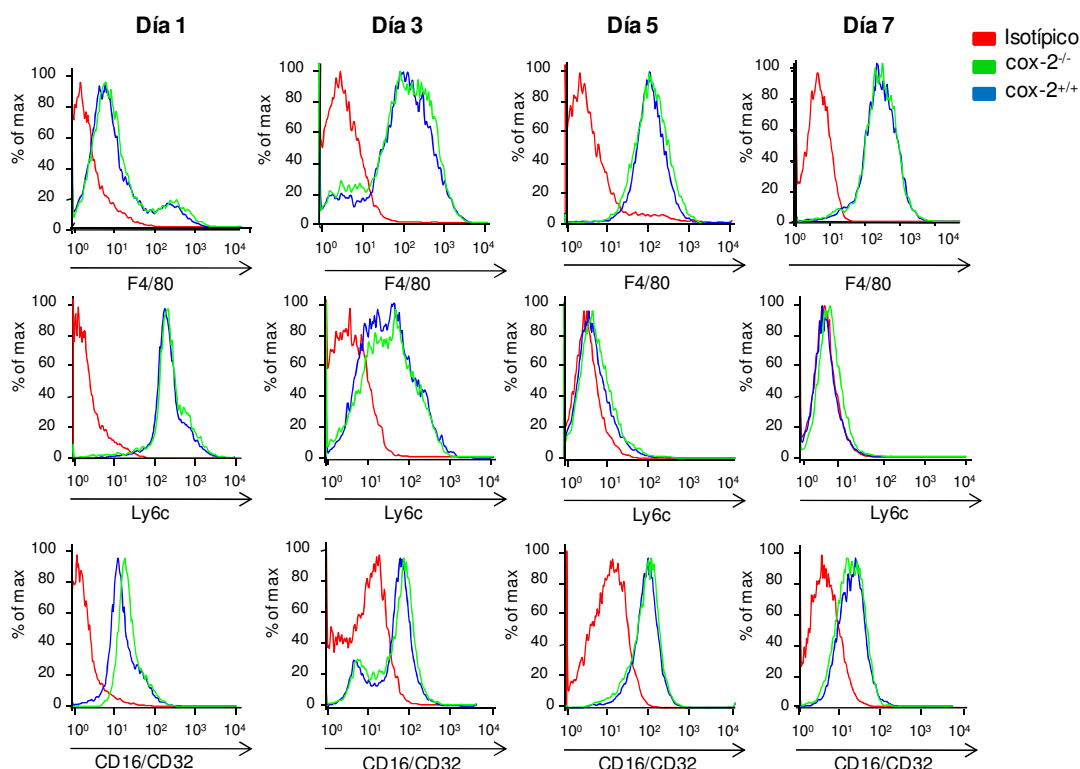


Figura 8. Análisis del proceso de diferenciación de macrófagos derivados de médula ósea de ratones $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$.

Análisis de la expresión de diferentes marcadores de membrana, F4/80, Ly6c, CD16/CD32, durante diferentes días del proceso de diferenciación, a partir de células de la médula ósea pertenecientes a ratones $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$, analizado por citometría de flujo.

2.4. Papel de GMCSF-R y de CD11c en el proceso de diferenciación de los macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ derivados de médula ósea.

A su vez quisimos estudiar la expresión del receptor de GM-CSF durante el proceso de diferenciación de los macrófagos. Como en el experimento anterior, analizamos durante los días 1, 3, 5 y 7 de diferenciación de macrófagos derivados de médula ósea, la expresión en membrana del receptor de GM-CSF mediante citometría de flujo (Figura 9), sin encontrar diferencias en su expresión en membrana entre los ratones $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$.

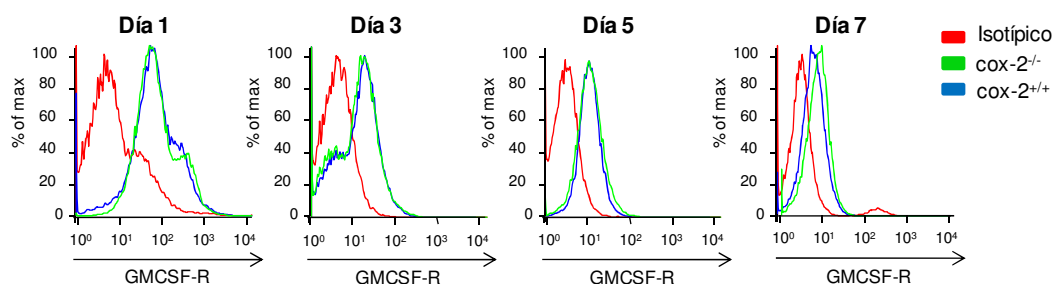


Figura 9. Análisis de GMCSF-R durante la diferenciación de los macrófagos derivados de médula ósea.

Análisis de la expresión del receptor de GMCSF de macrófagos derivados de médula ósea pertenecientes a ratones $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$, analizadas por citometría de flujo.

Una vez visto la deficiencia en CD11c de los macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$ durante su maduración, quisimos estudiar su papel en procesos de diferenciación de macrófagos derivados de médula ósea. Para ello analizamos en primer lugar su expresión en membrana, mediante citometría, durante los días de diferenciación 1, 3, 5 y 7 (Figura 10.A). Como se puede observar CD11c presenta bajos niveles de expresión en membrana que se reducen aún más a medida que las células se van diferenciando a macrófagos. Cabe destacar una menor expresión de CD11c en el séptimo día de diferenciación en el caso de los macrófagos derivados de médula ósea procedentes de ratones $\text{cox-2}^{-/-}$, es decir en un macrófago diferenciado se observa una menor expresión de CD11c en los $\text{cox-2}^{-/-}$. Debido a esa baja expresión en membrana de CD11c decidimos analizar por Western Blot su expresión a nivel de proteína total (Figura 10.B). En contraste con la expresión en membrana, se observa que CD11c se induce durante la diferenciación sobre todo al final del proceso, unido con la aparición de la expresión de Cox-2 (Figura 10.C), existiendo

una reducción significativa de CD11c a partir del 5º día de diferenciación de los macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$ en comparación con los $\text{cox-2}^{+/+}$.

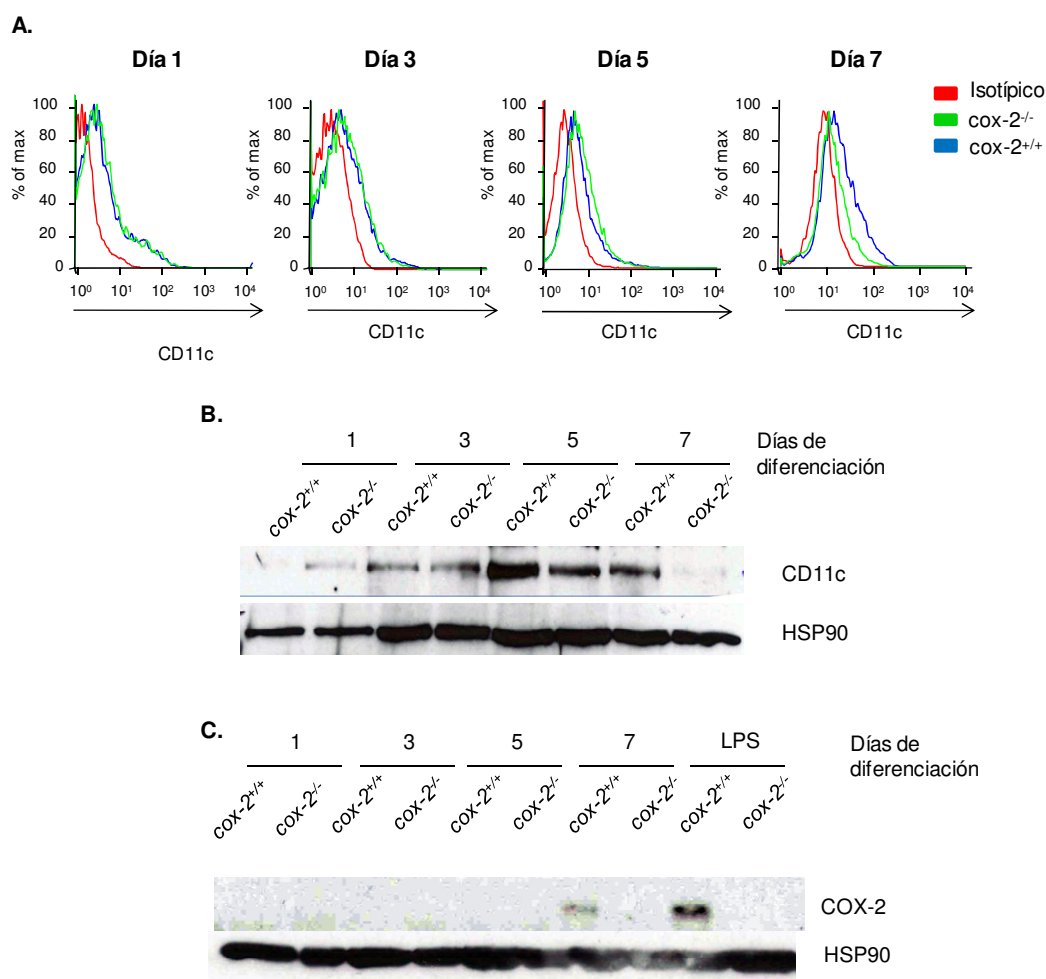


Figura 10. La deficiencia en Cox-2 afecta a la expresión de CD11c durante el proceso de diferenciación de macrófagos derivados de médula ósea.

(A) Análisis de la expresión de CD11c durante los diferentes días del proceso de diferenciación, 1, 3, 5 y 7 a partir de células de la médula ósea pertenecientes a ratones $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ analizado por citometría de flujo. (B) Inducción de la expresión de CD11c durante los diferentes días de diferenciación de macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ derivados de médula ósea analizado por Western Blot. (C) Expresión de Cox-2 durante los diferentes días de diferenciación o tras activación con LPS, de macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ derivados de médula ósea analizado por inmunotransferencia.

2.5. Estudio de otras integrinas durante el proceso de diferenciación de los macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ derivados de médula ósea.

Al observarse diferencias en CD11c nos planteamos estudiar la expresión de otras integrinas de membrana durante el proceso de diferenciación de macrófagos derivados de médula ósea. Para ello extrajimos los fémures de ratones $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$, aislamos y cultivamos las células de la médula ósea durante 7 días con medio suplementado con LCM. Como se observa en la [Figura 11](#) no encontramos diferencias en la expresión de membrana analizada por citometría de otras integrinas como ICAM-1, CD29, CD11b y CD11a entre ratones $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$.

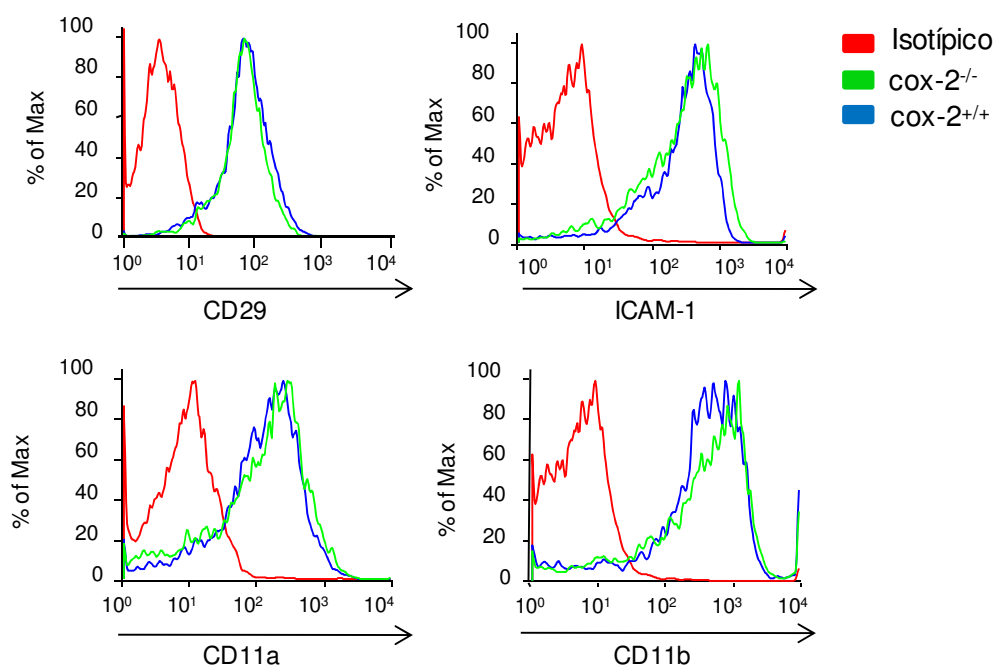


Figura 11. Análisis de diferentes integrinas de membrana de los macrófagos derivados de médula ósea procedentes de ratones $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$.

Análisis de la expresión de diferentes integrinas de membrana, CD29, ICAM-1, CD11a y CD11b, de macrófagos derivados de médula ósea pertenecientes a ratones $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$, analizadas por citometría de flujo.

3. Papel de Cox-2 en fagocitosis y en presentación de antígeno.

Los macrófagos son esenciales para la protección frente a infecciones, en gran parte debido a su capacidad única de ingerir y degradar a microorganismos, y también por actuar como célula presentadora de antígeno a células T.

3.1. Efecto de COX-2 en la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales.

Se ha descrito que CD11c está involucrada en la fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos humanos como del patógeno *Francisella tularensis* (Ben Nasr et al., 2006; Rosas-Taraco et al., 2009b). Debido a la baja expresión de CD11c de los macrófagos *cox-2*^{-/-} decidimos analizar qué efecto tiene su ausencia en este proceso.

Analizamos para ello la capacidad tanto de fagocitar patógenos, de la bacteria *E.coli*, como de degradarla intracelularmente. Una vez extraídos los macrófagos peritoneales, los co-cultivábamos a diferentes tiempos de estudio con la bacteria *E.coli* XL1Blue en una relación 1:10, es decir 10 bacterias por cada macrófago. Posteriormente se trataron los macrófagos con gentamicina para eliminar las bacterias que no se han internalizado por la célula. Al final del cultivo se procedió a la lisis celular con detergentes, para después cultivar en placas de LB el resultado del lisado celular. Al día siguiente se contabilizaron las colonias bacterianas crecidas procedentes del lisado. Como se muestra en la [Figura 12](#), a lo largo del tiempo se produce una reducción en el número de colonias, mostrando la capacidad bactericida por parte de los macrófagos. Cabe destacar que los macrófagos *cox-2*^{-/-} presentan una capacidad bactericida menor en comparación con los *cox-2*^{+/+}, aunque la fagocitosis inicial de bacterias es similar durante los primeros 15 minutos.

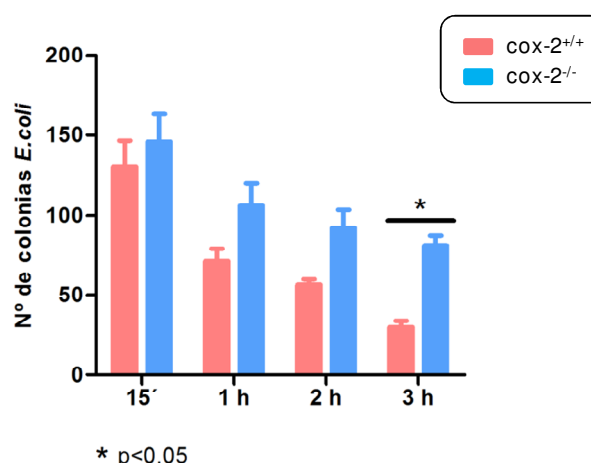


Figura 12. Estudio de la capacidad fagocítica y bactericida de los macrófagos peritoneales *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-}.

Colonias de *E.coli* viables obtenidas de los macrófagos peritoneales co-cultivados con *E.Coli* durante diferentes tiempos. Datos expresados como la media del nº de colonias ± SEM, test de Anova (n= 6 animales de cada grupo por duplicado).

3.2. La ausencia de Cox-2 implica una reducción en la expresión de iNOS y en la producción de NO inducida por LPS e IFN γ .

Una vez fagocitado al patógeno, los macrófagos ya activados lo destruyen mediante moléculas microbicidas. Una de estas moléculas es el óxido nítrico (NO), producida por la acción de la enzima iNOS. Esta enzima iNOS, se encuentra inactiva en macrófagos en reposo, pero puede inducirse como respuesta a LPS sobre todo en conjunción con IFN γ (Kobayashi, 2010).

Debido a que los macrófagos deficientes en Cox-2 presentan una deficiencia a la hora de degradar bacteria decidimos analizar la producción de NO y la expresión de la enzima productora de NO, iNOS (Figura 13)

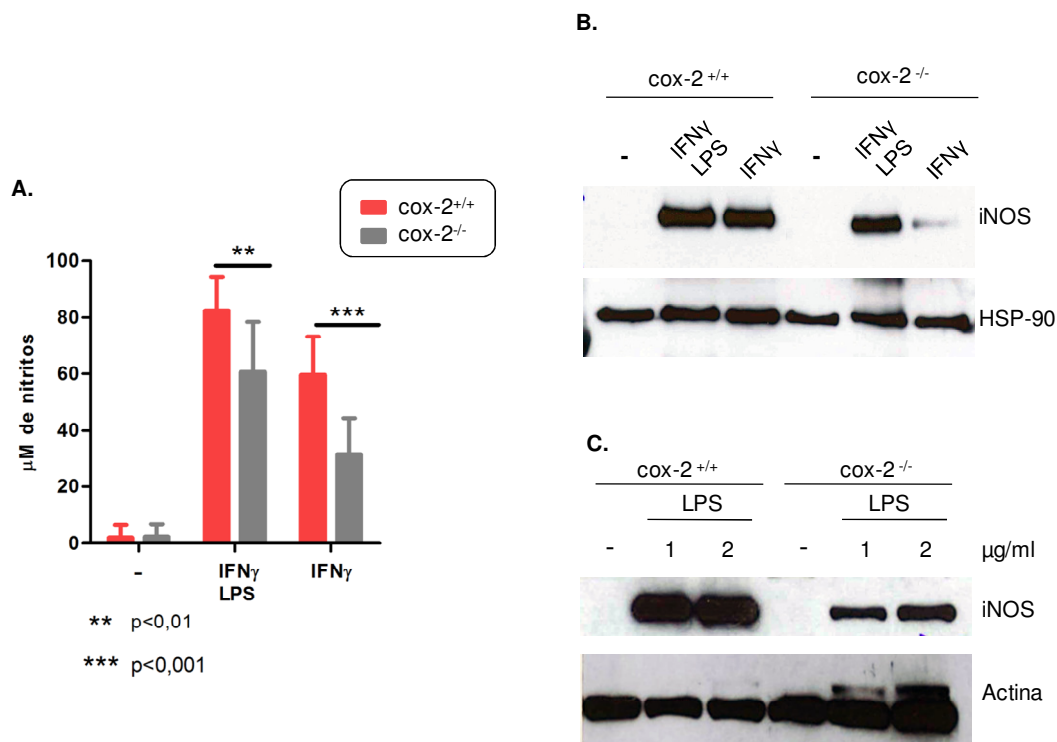


Figura 13. Estudio de la síntesis de NO y la expresión de iNOS en macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$.

(A) Concentración de nitritos en los sobrenadantes de los macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ tratados durante 24 h con los estímulos indicados. Datos obtenidos mediante el ensayo de griess y expresados como la media \pm SD, test de Anova ($n=6$ animales de cada grupo por duplicado). (B) Análisis por inmunotransferencia de la expresión de iNOS a las 24 h de los tratamientos con los estímulos indicados. (C) Análisis por inmunotransferencia de la expresión de iNOS a las 24 h del tratamiento con LPS.

La producción de NO fue evaluada mediante un ensayo de Griess a partir de los sobrenadantes de los macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$, tratados durante 24 horas con LPS o LPS+IFN γ . Como se observa en la [Figura 13.A](#) los estímulos con LPS e IFN γ inducen la producción de NO. Curiosamente los macrófagos deficientes en Cox-2 presentan una menor producción de NO tanto con tratamientos con LPS, como combinado con IFN γ con respecto a los $\text{cox-2}^{+/+}$. Estudios de la expresión de la enzima iNOS mediante Western Blot en macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ tratados durante 24 horas con LPS+IFN γ y LPS ([Figura 13.B](#)) como con LPS a concentraciones crecientes ([Figura 13.C](#)), sugieren que la baja producción de nitritos en los macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$ es debido a una expresión reducida de la enzima iNOS, según lo observado en tratamientos con LPS. Estos resultados apoyan la reducida capacidad bactericida de los macrófagos deficientes en Cox-2.

NF- κ B es un importante factor de transcripción implicado en la respuesta innata y adaptativa. Generalmente NF- κ B se encuentra de forma inactiva unido a la proteína inhibidora I κ B, pero una vez que se produce la fosforilación de I κ B, se disocia la unión NF- κ B-I κ B permitiendo la entrada de NF- κ B al núcleo. En macrófagos peritoneales NF- κ B tiene un papel importante en la regulación de la actividad de iNOS inducida por LPS o IFN (Vila-del Sol et al., 2007).

Debido a los resultados obtenidos anteriormente decidimos analizar de forma indirecta la actividad de NF- κ B a través de la expresión de I κ B y su forma fosforilada en macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ mediante inmunotransferencia ([Figura 14](#)). Estimulamos con LPS durante 24 horas a los macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$. Además tratamos los macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ con el inhibidor de Cox-2, Celecoxib, 1 hora antes de la estimulación con LPS. Los resultados muestran que los macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$ ya presentan una menor expresión de I κ B a nivel basal. La activación por LPS indujo una degradación de I κ B asociado a su fosforilación. Por el contrario la degradación y fosforilación de I κ B fue menor en macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$ tratados con LPS. Esto implica una menor activación de NF- κ B, y probablemente por tanto una menor inducción de iNOS como hemos observado anteriormente.

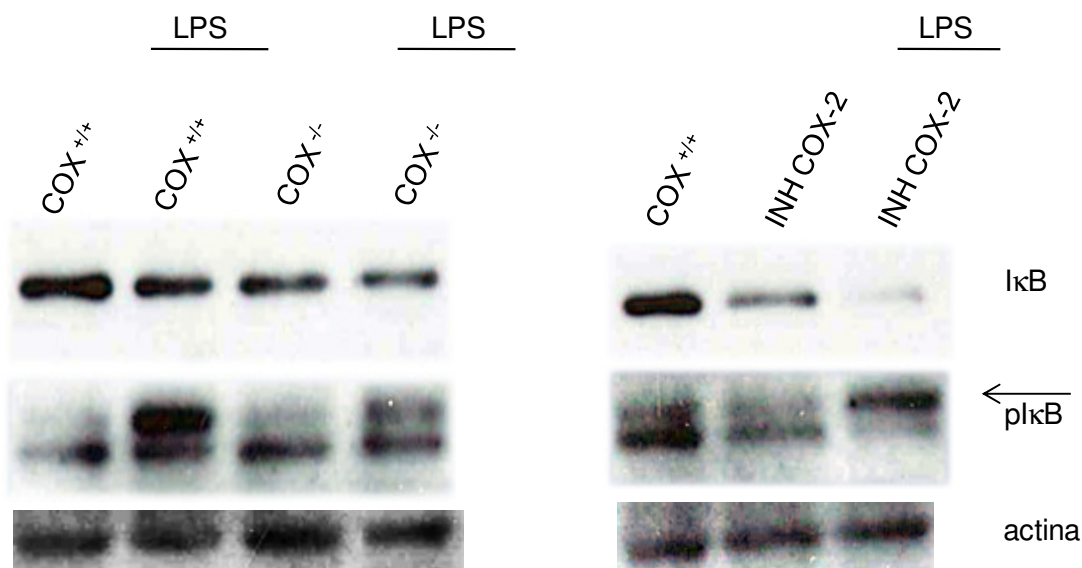


Figura 14. Análisis de la inducción de la fosforilación de IκB por LPS en macrófagos peritoneales $cox-2^{+/+}$ y $cox-2^{-/-}$.

Los macrófagos peritoneales de animales $cox-2^{+/+}$ y $cox-2^{-/-}$ fueron tratados o no con inhibidores de Cox-2 (Celecoxib 0,1 μ M) una hora antes de estimular o no con LPS durante 18 h. La presencia tanto de la forma fosforilada como de la total de IκB se determinó por inmunotransferencia.

3.3. Papel de COX-2 en la activación de macrófagos peritoneales.

Como se ha mencionado en la introducción los macrófagos pueden presentar diferentes vías de activación: la clásica, la innata y la adaptativa. En la activación innata los linfocitos T activan a los macrófagos mediante señales mediadas por la interacción CD40L-CD40. La unión de CD40 a su ligando activa a su vez a factores de transcripción como NF-κB (Pype et al., 2000).

Para determinar el grado de activación de los macrófagos y por tanto su responsabilidad en la inmunidad celular, decidimos analizar mediante citometría de flujo la expresión en membrana de CD40 en macrófagos $cox-2^{+/+}$ y $cox-2^{-/-}$ tratados con LPS durante 24 horas. Como se observa en la [Figura 15](#), tratamientos con LPS incrementan la expresión de CD40 en los macrófagos $cox-2^{+/+}$ mientras que en los macrófagos deficientes en Cox apenas se induce CD40.

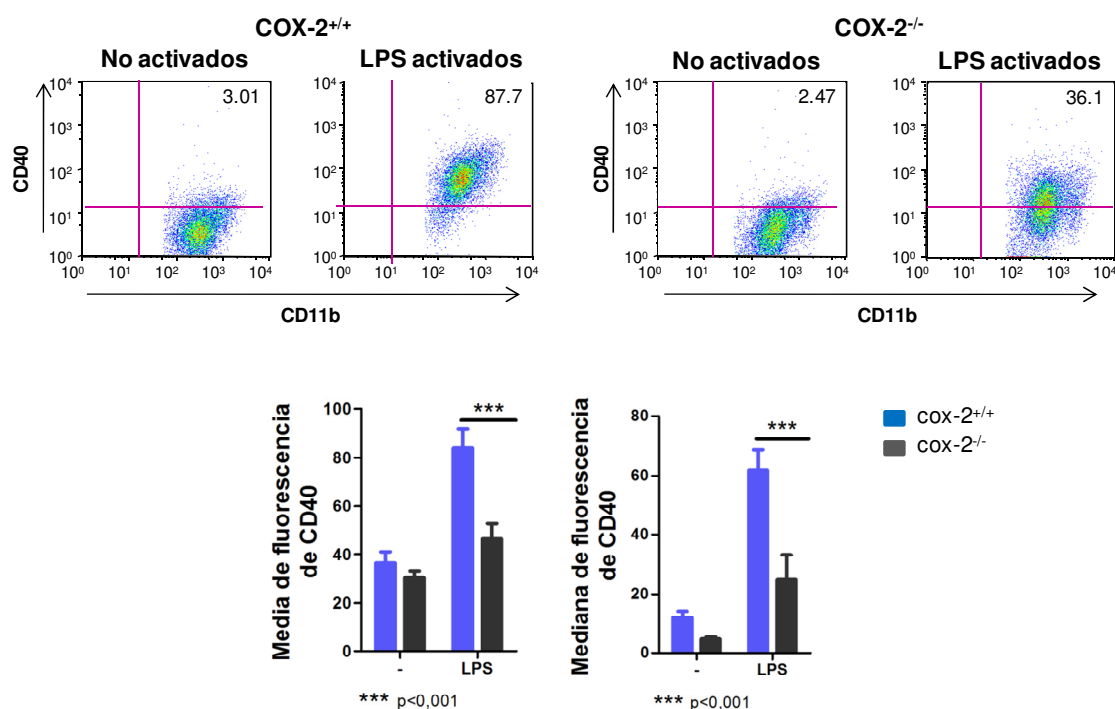


Figura 15. Expresión en membrana del marcador de activación CD40 en macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$.

Análisis mediante citometría de flujo de la expresión en membrana de CD40 en macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ CD11b⁺, tratados con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 h. Los datos de la media y la mediana de fluorescencia son expresados como la media \pm SEM, test de Anova (n=9 ratones de cada grupo).

Los macrófagos presentan antígenos a las células T a través de las moléculas de histocompatibilidad MHC, cuya expresión se induce en respuesta a patógenos, citoquinas proinflamatorias, IFN γ y LPS (Gordon & Taylor, 2005). Mediante citometría de flujo analizamos la expresión del MHCII en macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ tratados durante 24 horas con IFN γ (Figura 16). Los resultados indican que la ausencia de Cox-2 no altera la expresión de MHCII pero que si existe una distribución del MHCII en membrana alterada, reflejada en la diferente mediana de fluorescencia.

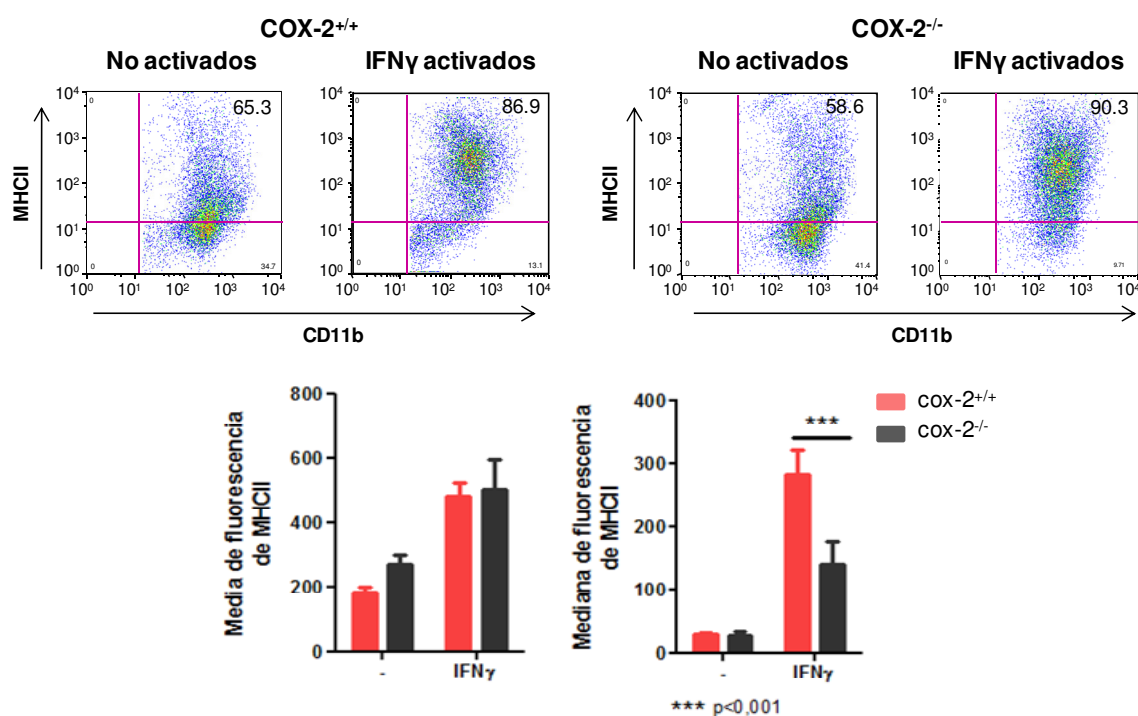


Figura 16. Expresión en membrana de MHCII en macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$.

Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de MHCII en macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ CD11b^+ tratados con IFN γ (100 U/ml) durante 24 h. Los datos de la media y la mediana de fluorescencia son expresados como la media \pm SEM, test de Anova (n=9 ratones de cada grupo).

Existen otros receptores que también reconocen moléculas microbianas como es el caso de CD68, el cual actúa como un receptor fagocítico. Por otro lado existen otras señales necesarias para la activación de los linfocitos T procedentes de moléculas que se denominan coestimuladoras. Los coestimuladores mejor definidos son CD80 y CD86 los cuales se expresan en células dendríticas como en macrófagos. La expresión de los coestimuladores es aumentada por productos microbianos como el LPS, y por citocinas que se producen durante las reacciones inmunitarias frente a los microorganismos (Gordon, 2003).

Por todo ello analizamos la expresión del receptor fagocítico CD68 como de CD80 y CD86 mediante citometría en macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ tratados durante 24 horas con LPS. Como se muestra en la [Figura 17](#), los macrófagos deficientes en Cox-2

presentan una reducción significativa en la expresión de CD68 y de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en respuesta a LPS y también en ausencia de activación.

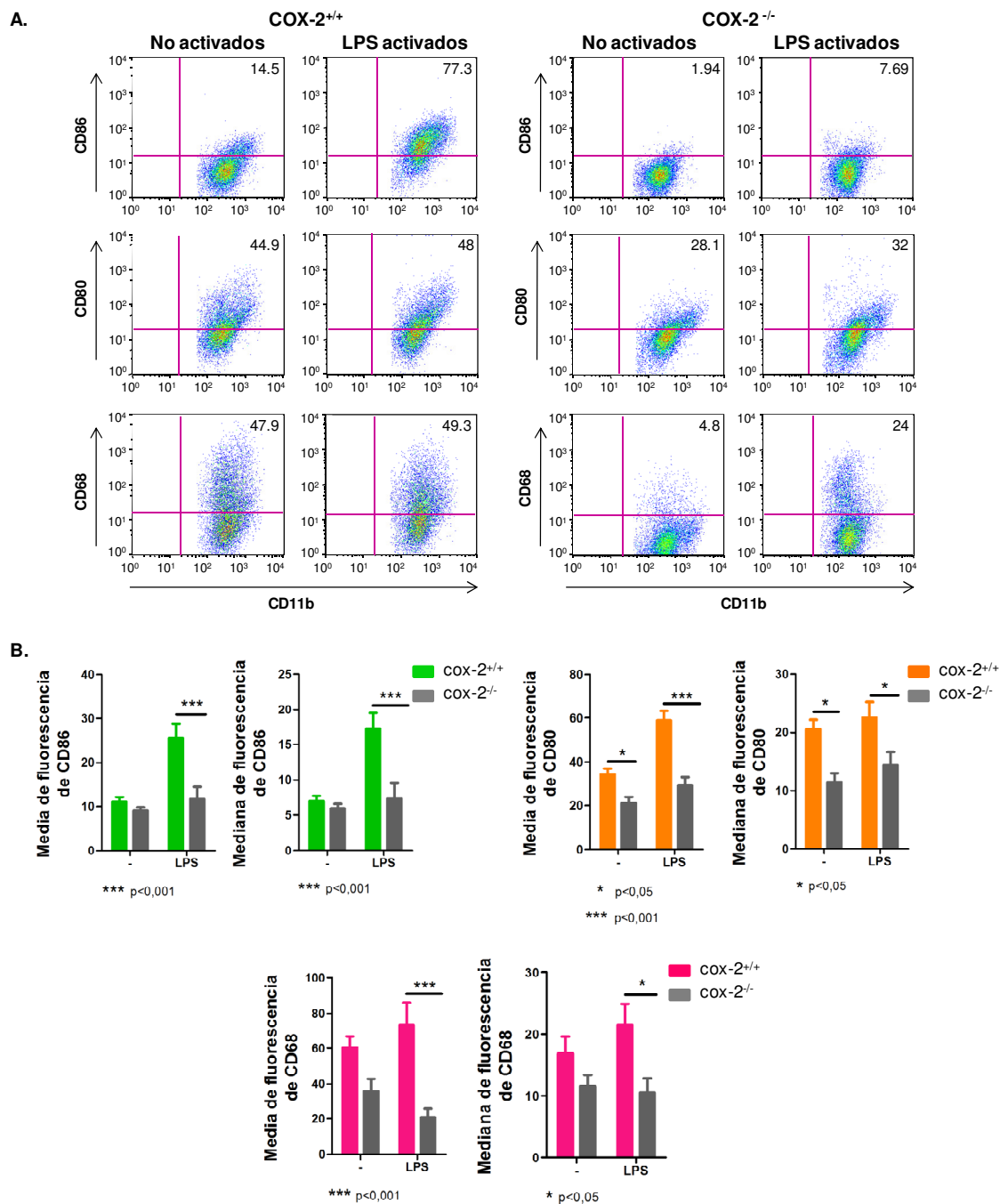


Figura 17. Los macrófagos peritoneales *cox-2^{-/-}* presenta una menor expresión de moléculas coestimuladoras CD86, CD80 y CD68.

(A y B) Análisis mediante citometría de flujo de la expresión en membrana de CD86, CD80 y de CD68 en macrófagos peritoneales *cox-2^{+/+}* y *cox-2^{-/-}* CD11b⁺, tratados con LPS (1μg/ml) durante 24 h. Los datos de la media y la mediana de fluorescencia son expresados como la media ± SEM, test de Anova (n=9 ratones de cada grupo).

3.4. Expresión de citoquinas y quimioquinas secretadas por los macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$, activados con LPS.

Aparte de destruir los microorganismos fagocitados y actuar como presentadoras de antígeno a células T, los macrófagos cumplen otras muchas funciones de defensa contra las infecciones en gran parte mediadas por la secreción de múltiples citoquinas y quimioquinas y que definen sus propiedades funcionales. Tratamos los macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ durante 24 horas con LPS y a partir del sobrenadante de los cultivos de los macrófagos realizamos la determinación de citoquinas por CBA (Figura 18).

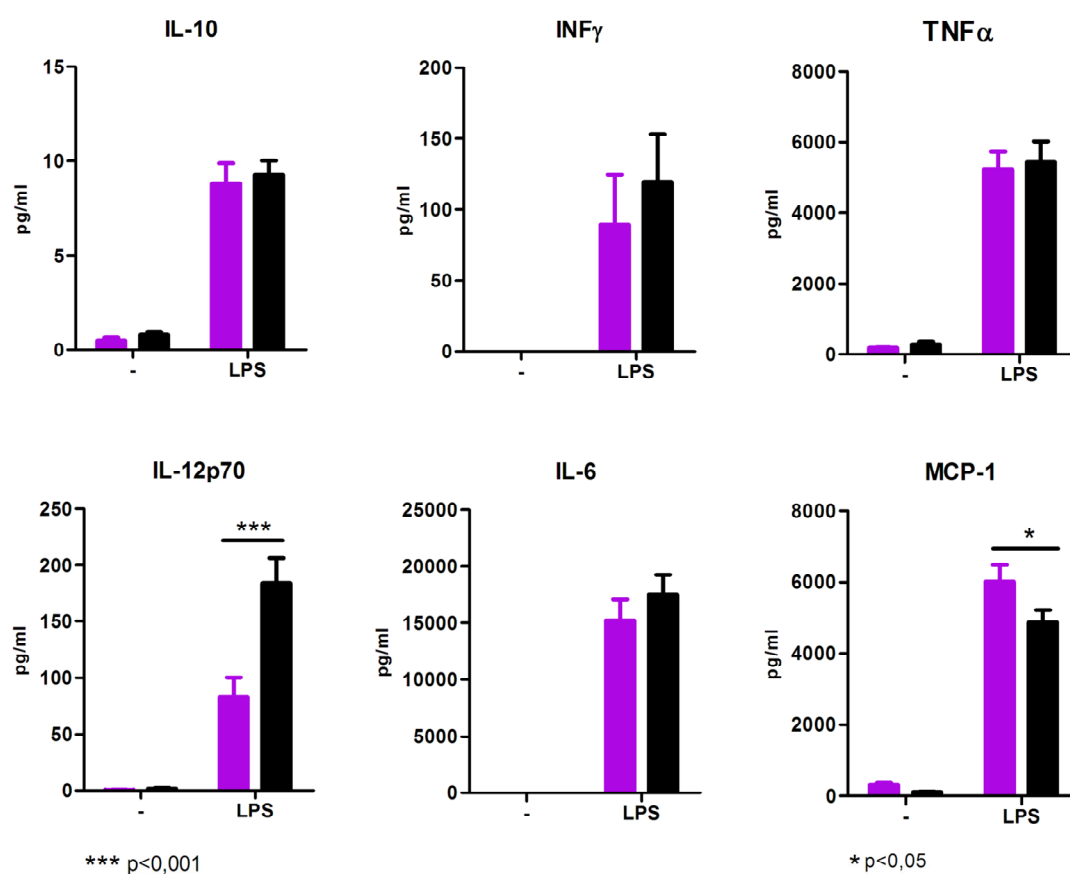


Figura 18. Los ratones deficientes en Cox-2 presentan una mayor producción de la citoquina IL-12p70 y una menor producción de la quimioquina MCP-1.

Análisis de la producción de citoquinas y quimioquinas secretadas por los macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$, activados con LPS durante 24 h.a través de la técnica de CBA (cytometric beads array). Datos expresados como la media \pm SEM, test de Anova (n=10 ratones de cada grupo).

Se puede observar por un lado que los macrófagos deficientes en Cox-2 presentan una secreción significativamente mayor de la IL-12p70, mientras que observamos una secreción significativamente menor de MCP-1 en comparación con los macrófagos *cox-2^{+/+}*. No encontramos diferencias en cuanto a la producción de IL-10, IFN γ , TNF α e IL-6 entre los macrófagos *cox-2^{+/+}* y *cox-2^{-/-}*.

Es importante mencionar que tratamientos con LPS durante 24 horas no afectaron a la integridad celular de los macrófagos peritoneales *cox-2^{+/+}* y *cox-2^{-/-}* (Figura 19), analizando mediante citometría de flujo, la expresión en membrana de AnexinaV unida al marcador vital 7-AAD.

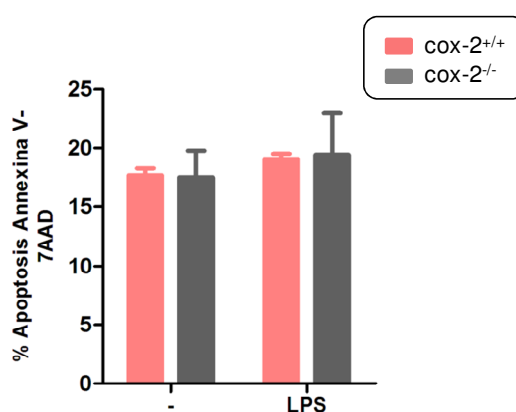


Figura 19. Efecto del LPS en la apoptosis de macrófagos *cox-2^{+/+}* y *cox-2^{-/-}*.

Tinción celular con Anexina V y 7-AAD de los macrófagos peritoneales *cox-2^{+/+}* y *cox-2^{-/-}* tras estimulación con LPS durante 24 h. Datos analizados por citometría de flujo y expresados como la media \pm SD del porcentaje de células anexina V⁺/7-AAD⁺ (n=8 animales de cada grupo).

3.5. Efecto de Cox-2 en la presentación de antígeno de los macrófagos peritoneales a células T.

Teniendo en cuenta que los macrófagos deficientes en Cox-2 presentan por un lado una distribución alterada en membrana de MHCII y a su vez una menor expresión de diferentes moléculas coestimuladoras, quisimos analizar la capacidad de los macrófagos *cox-2^{+/+}* y *cox-2^{-/-}* en presentar antígeno a las células T CD4⁺. Para ello se aislaron las células T de los nódulos linfáticos de los ratones OTII (compatibles a nivel del haplotipo de MHCII con los ratones *cox-2^{+/+}* y *cox-2^{-/-}*), las cuales se marcaron con una sonda violeta (CellTrace Violet). Por otro lado, tras la inducción de peritonitis por tioglicolato,

se extrajeron los macrófagos peritoneales y se cargaron durante toda la noche con el péptido OVA (323-339) y con ovoalbúmina. Una vez cargados los macrófagos se co-cultivaron con los linfocitos T durante tres días. Pasadas las primeras 24 horas se analizaron por citometría los marcadores de activación de linfocitos T CD4⁺, CD69 y CD25 (Figura 20.A). Se puede observar que los macrófagos cox-2^{-/-} activan menos a los linfocitos CD4⁺ a concentraciones elevadas tanto de péptido de OVA como de ovoalbúmina. Por otro lado se llevó a cabo el análisis de la proliferación de las células T CD4⁺, al 3° día de estar co-cultivadas con los macrófagos peritoneales, (Figura 20.B) observándose una cierta disminución no significativa en el índice de proliferación de las células T CD4⁺ activadas por los macrófagos cox-2^{-/-}.

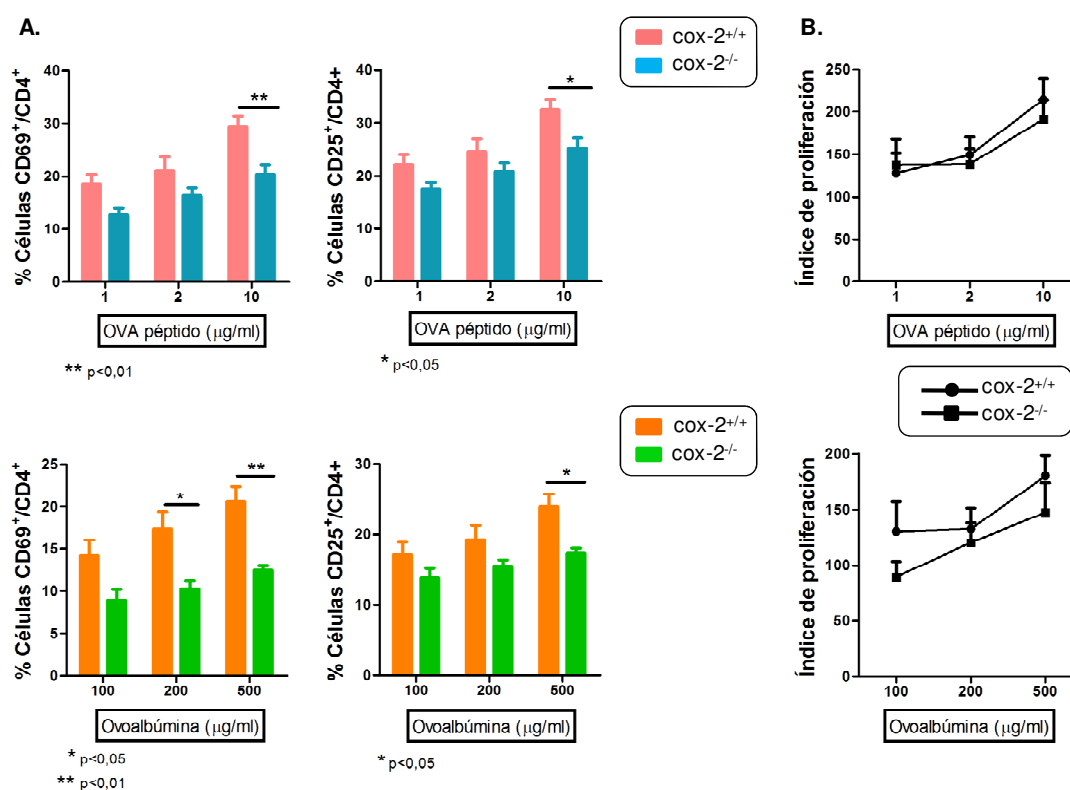


Figura 20. Papel de COX-2 en la presentación de antígeno a células T CD4⁺.

(A) Porcentaje de células CD25⁺ y CD69⁺, marcadores de activación de linfocitos T CD4⁺ capaces de reconocer OVA péptido y ovoalbúmina presentados por los macrófagos peritoneales cox-2^{+/+} y cox-2^{-/-}. Los datos se obtuvieron mediante citometría de flujo y son expresados como la media del porcentaje de células positivas para los diferentes marcadores ± SEM, test de Anova (n=4 animales de cada grupo por triplicado). (B) Índice de proliferación de los linfocitos T CD4⁺ al tercer día de co-cultivo con los macrófagos peritoneales cox-2^{+/+} y cox-2^{-/-} cargados con OVA péptido y ovoalbúmina. Datos analizados por citometría de flujo y expresados como el n° de divisiones/tanto por uno de células que no se dividen (n=4 animales de cada grupo por triplicado).

Por lo tanto los macrófagos deficientes en Cox-2 son capaces de procesar el péptido y de presentarlo a las células T a nivel del MHCII. Hay que tener en cuenta que los niveles tanto de moléculas co-estimuladoras como de CD40 son menores, lo que daría como resultado una menor activación de las células T.

4. Implicación de Cox-2 en la adhesión y migración de los macrófagos.

La migración celular, incluyendo la infiltración leucocitaria al foco de infección, es un proceso clave durante cada paso de la respuesta inflamatoria. Por otro lado, la infección bacteriana en la cavidad peritoneal, induce una respuesta inmune T-independiente que implica la migración reversa de células B, células dendríticas y de macrófagos hacia los nódulos linfáticos (Broche & Tellado, 2001).

Por ello nuestro siguiente objetivo fue analizar la importancia de Cox-2 en la migración y adhesión de los macrófagos y los mecanismos moleculares implicados.

4.1. Papel de COX-2 en la migración de macrófagos hacia el foco inflamatorio.

Durante las primeras horas del proceso inflamatorio se produce una respuesta secuencial de diferentes tipos celulares. En primer lugar actúan los neutrófilos, los cuales tienen una vida corta y se acumulan en pocas horas en el foco inflamatorio (Sadik et al., 2011) seguido por la acción de los macrófagos, los cuales contribuirán a la fagocitosis de los neutrófilos apoptóticos que ya han actuado, participando así en la resolución de la inflamación (Shibata et al., 2010; Soehnlein et al., 2009).

El estudio *in vivo* de la migración de células inmunes al peritoneo permite evaluar de forma eficiente la capacidad migratoria de los distintos tipos celulares. Para ello indujimos una peritonitis en ratones *cox-2^{+/+}* y *cox-2^{-/-}* con tioglicolato y analizamos las poblaciones mediante citometría de flujo a diferentes días. Podemos observar en la [Figura 21](#) que durante los primeros días de inflamación hay un alto porcentaje de neutrófilos, células positivas para GR1⁺/CD11b⁺, mientras que en los últimos días el porcentaje de células GR1⁺ se reducen notablemente y se incrementan marcadores propios de macrófagos, F4/80⁺/CD11b⁺. En los ratones deficientes en Cox-2 se produce un aparente incremento de células GR1⁺, pero es debido a una menor migración de los macrófagos F4/80⁺/CD11b⁺ hacía el foco inflamatorio.

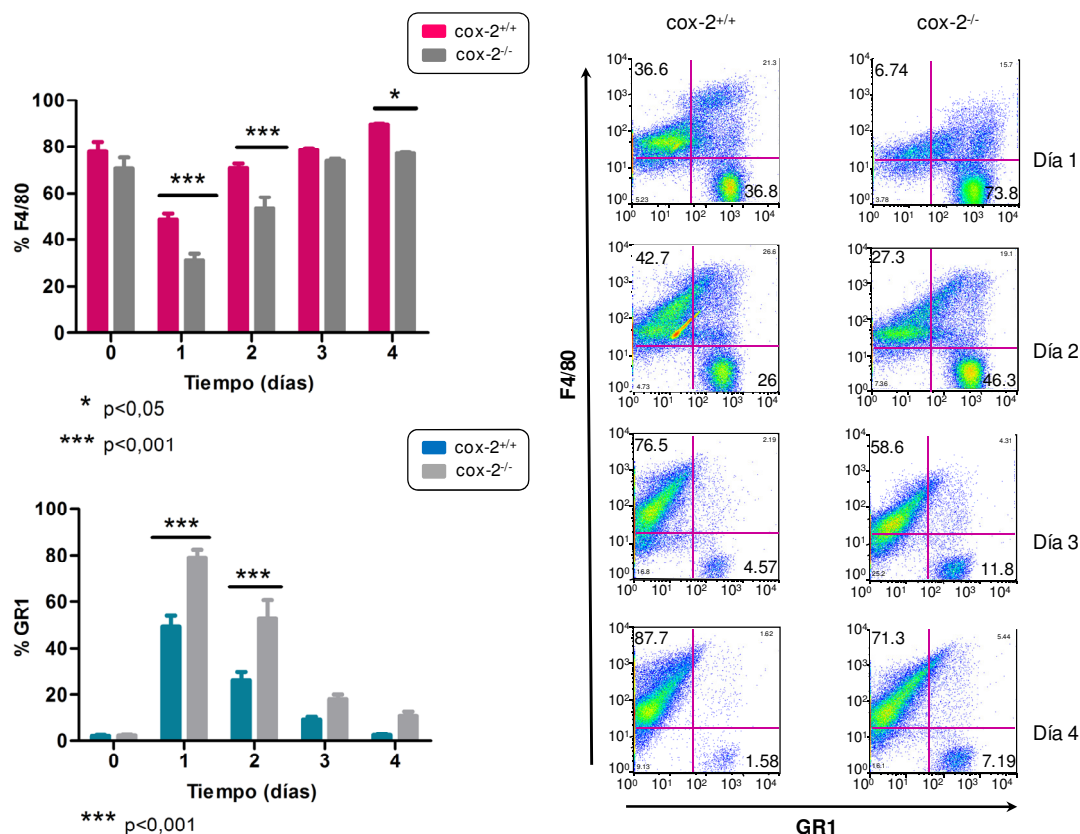


Figura 21. La ausencia de Cox-2 produce un retardo de la migración de los macrófagos hacia el peritoneo inflamado.

Análisis de células CD11b⁺/F4/80⁺ y CD11b⁺/GR1⁺ presentes en la cavidad peritoneal tras los distintos días de tratamiento con tioglicolato en ratones *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-}. Los datos se obtuvieron mediante citometría de flujo y son expresados como la media del porcentaje de células positivas para los diferentes marcadores \pm SEM, test de Anova (n=8 animales por grupo y día).

4.2. La expresión de Cox-2 es fundamental para la migración de macrófagos peritoneales.

El número reducido de macrófagos F4/80⁺/CD11b⁺ en ratones *cox-2*^{-/-} reclutados en la cavidad peritoneal tras un estímulo inflamatorio, sugiere un defecto en la capacidad migratoria de las células.

Con el objetivo de corroborar los datos obtenidos *in vivo*, decidimos aislar macrófagos peritoneales de los ratones *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-} para analizar su capacidad de migración *in vitro* en respuesta a diferentes quimioquinas (Figura 22). Para ello se emplearon las cámaras de migración “Trans-well”. Tras 24 horas analizamos la capacidad de migración

de los macrófagos en respuesta a 1 y 10 ng/ml de quimioquinas específicas (MCP-1, RANTES y MIP-1 α).

Como podemos observar en la [Figura 22.A](#) la ausencia de Cox-2 en macrófagos peritoneales reduce significativamente la migración en respuesta a diferentes quimioquinas.

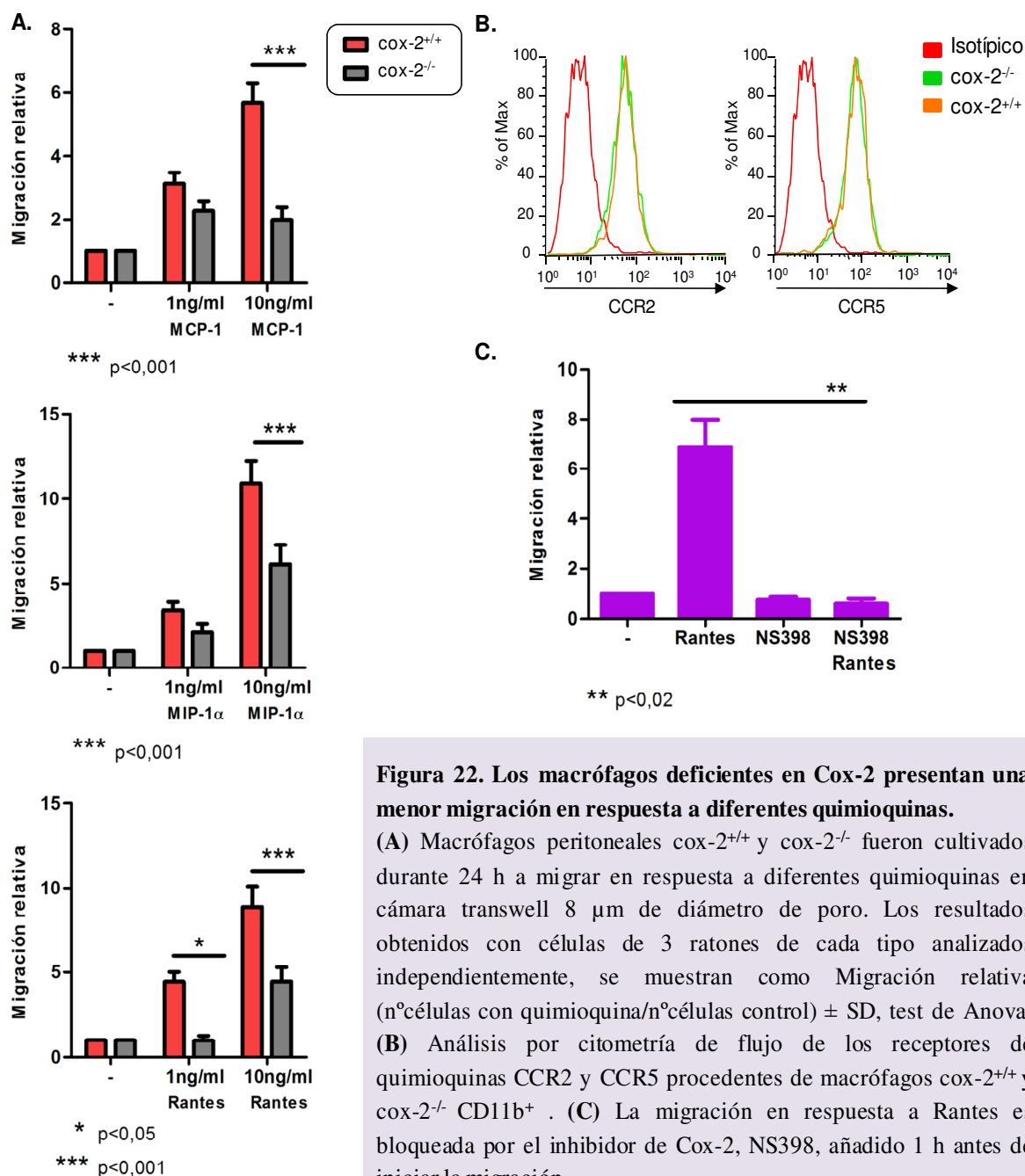


Figura 22. Los macrófagos deficientes en Cox-2 presentan una menor migración en respuesta a diferentes quimioquinas.

(A) Macrófagos peritoneales *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-} fueron cultivados durante 24 h a migrar en respuesta a diferentes quimioquinas en cámara transwell 8 μ m de diámetro de poro. Los resultados obtenidos con células de 3 ratones de cada tipo analizados independientemente, se muestran como Migración relativa (n°células con quimioquina/n°células control) \pm SD, test de Anova. (B) Análisis por citometría de flujo de los receptores de quimioquinas CCR2 y CCR5 procedentes de macrófagos *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-} CD11b⁺. (C) La migración en respuesta a Rantes es bloqueada por el inhibidor de Cox-2, NS398, añadido 1 h antes de iniciar la migración.

El análisis de la expresión en membrana de los distintos receptores de quimioquina (Figura 22.B) muestra que los macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{-/-}$ presentan niveles similares de CCR2 y de CCR5, sugiriendo que el defecto de migración no es debido a diferencias en la expresión de receptores de quimioquina. Con el fin de confirmar la deficiente migración de los macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$, inhibimos la actividad enzimática de Cox-2 con un inhibidor específico NS398 en macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$. Los macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ fueron pre-tratados con NS398 una hora antes de inducir la migración celular con Rantes. Como se observa en la Figura 22.C el pre-tratamiento con NS398 bloquea la migración *in vitro* en respuesta a la quimioquina Rantes, demostrando así que la actividad enzimática de Cox-2 es fundamental para la migración de los macrófagos.

4.3. Estudio *in vivo* del papel de Cox-2 en la emigración a nódulos linfáticos y adhesión a la membrana peritoneal de macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$.

Los macrófagos son capaces de emigrar desde la cavidad peritoneal hacia los nódulos linfáticos adyacentes en respuesta a LPS (Broche & Tellado, 2001). Esta emigración de macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ a los nódulos linfáticos nos permite valorar la importancia de Cox-2 en la migración *in vivo* de macrófagos. Para analizar el efecto de Cox-2 en este proceso extrajimos macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$, los cuales fueron marcados con el fluorescente PKH26 PLC. Las células PKH26⁺ se transfirieron a la cavidad peritoneal de ratones receptores 129SV/C57BL6 y tras ser estimuladas i.p. durante 4 horas con LPS, se extrajeron los nódulos linfáticos y se realizaron lavados peritoneales de la cavidad. Como se muestra en la Figura 23.A el número de macrófagos PKH26⁺ que permanecen en la cavidad peritoneal de los ratones tras la estimulación con LPS fue significativamente menor que los controles con PBS, lo que indica una emigración de los macrófagos en respuesta a LPS. El número de macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$ (PKH26⁺) retenidos en la cavidad peritoneal tras la estimulación con LPS, fue significativamente mayor en comparación con los macrófagos retenidos $\text{cox-2}^{+/+}$, mostrando una menor habilidad de los macrófagos deficientes en Cox-2 a migrar fuera de la cavidad peritoneal. Para corroborar que la emigración de los macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$ está afectada (Figura 23.B) analizamos por microscopia los macrófagos PKH26⁺ encontrados en los nódulos linfáticos extraídos. Los resultados muestran una reducción significativa en el número de macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$ en el nódulo linfático en comparación con los $\text{cox-2}^{+/+}$.

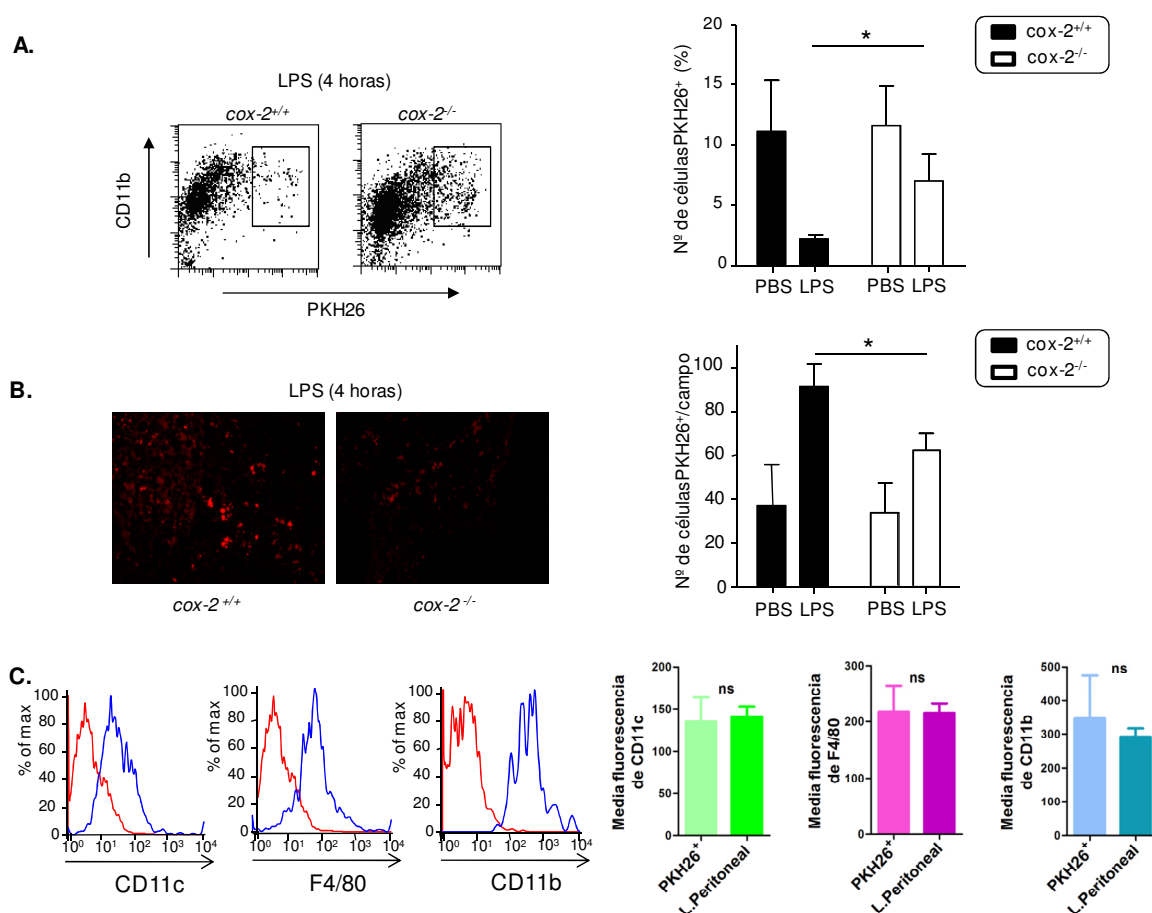


Figura 23. La emigración retroperitoneal *in vivo* de los macrófagos deficientes en Cox-2 está disminuida.

Los macrófagos peritoneales de ratones *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-} fueron aislados tras 4 días de la inyección de tioglicolato. Las células fueron marcadas con PKH26 antes de transferirlas a la cavidad peritoneal de los ratones C57BL/6 para seguir la emigración celular desde la cavidad peritoneal hasta los nódulos linfáticos. **(A)** Análisis de los exudados peritoneales de los ratones *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-} tras la estimulación con LPS. Los macrófagos *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-} fueron analizadas por citometría 4 h. después de la inyección de LPS (1 µg en PBS, i.p.). Los datos se muestran como el porcentaje de células PKH26⁺ ± SD, t-student (n=4 ratones de cada grupo). **(B)** Detección por microscopía de los macrófagos PKH26⁺ en los nódulos linfáticos inguinales, poplíteos y axilares. Fueron analizados 4 campos diferentes (40x magnificación) por criosección del tejido (5 µm). Los datos se muestran como la media ± SEM, t-student (n=4 ratones de cada grupo). **(C)** Análisis comparativo de la expresión en membrana de CD11c, F4/80 y CD11b, de los macrófagos peritoneales PKH26⁺ recuperados de los nódulos linfáticos y de los macrófagos obtenidos de los lavados peritoneales. Analizado por citometría de flujo.

Para determinar que las células analizadas en los nódulos linfáticos son los macrófagos peritoneales obtenidos en el principio del experimento (Figura 23.C), decidimos disgregar los nódulos y analizar mediante citometría los marcadores CD11c, F4/80 y CD11b en las células extraídas, para posteriormente compararlos con los macrófagos peritoneales procedentes de los lavados peritoneales. Como se puede observar ambos presentan un fenotipo semejante.

Como todo proceso de migración celular requiere de una adhesión previa decidimos analizar el efecto de la deficiencia de Cox-2 en la adhesión de macrófagos a la membrana peritoneal empleando nuestro modelo experimental *in vivo*. Para ello transferimos macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ marcados anteriormente con PKH26, a la cavidad peritoneal de ratones receptores 129SV/C57BL6, y tras ser estimuladas i.p. durante 5 minutos con LPS, se extrajo la membrana peritoneal y se determinó las células adheridas.

Los resultados que obtuvimos (Figura 24.A) muestran que el tratamiento con LPS implica una reducción significativa en el número de macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ PKH26⁺ procedente de los lavados peritoneales en comparación con los controles con PBS. Esto coincide con que los tratamientos con LPS permiten la adhesión al mesotelio de los macrófagos. Curiosamente no observamos el mismo efecto en el caso de los macrófagos transferidos $\text{cox-2}^{-/-}$. Cuantificando el número de macrófagos PKH26⁺ en varios campos de la membrana peritoneal (Figura 24.B), podemos observar un incremento en la adhesión de los macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ tras la estimulación con LPS. Por el contrario los macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$ se adhieren menos al mesotelio, y en su lugar permanecen en la cavidad peritoneal.

Por lo tanto una reducida adhesión celular podría explicar la migración defectiva de los macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$ en respuesta a LPS.

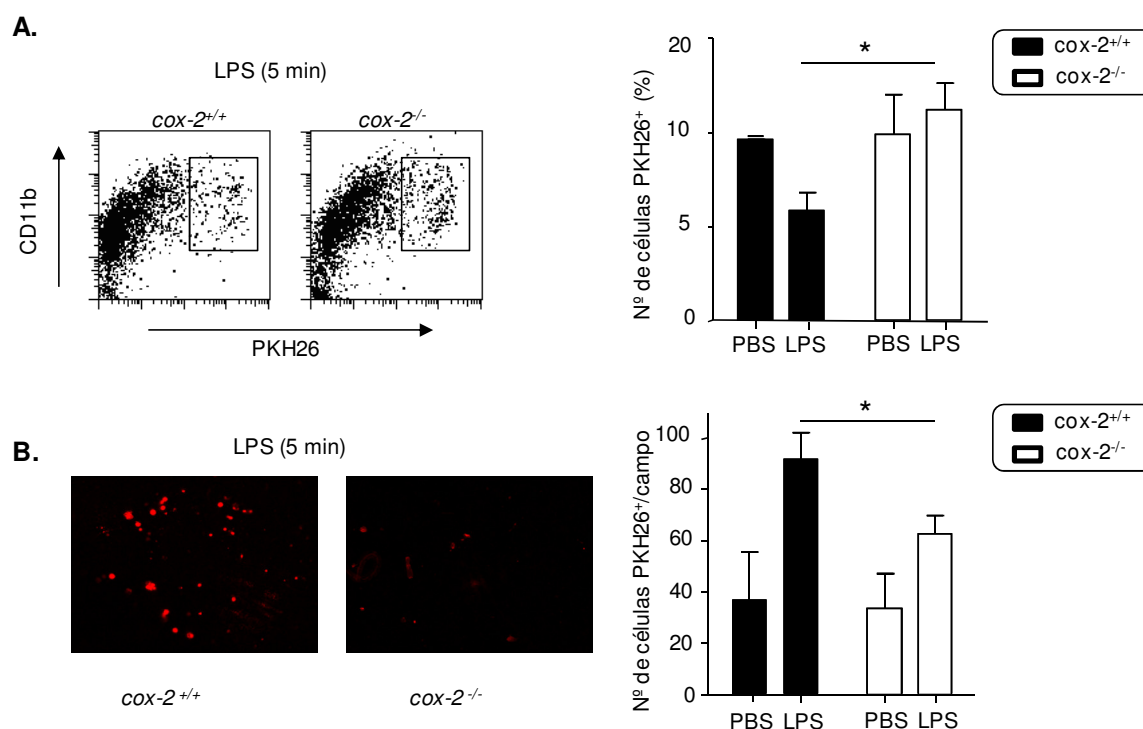


Figura 24. La adhesión de los macrófagos a la membrana peritoneal se encuentra reducida en ausencia de Cox-2.

(A) Análisis por citometría de flujo de los macrófagos peritoneales (CD11B⁺/PKH26⁺) de los ratones *cox-2^{+/+}* y *cox-2^{-/-}* que permanecen en la cavidad peritoneal. Los macrófagos *cox-2^{+/+}* y *cox-2^{-/-}* fueron marcados con PKH26 antes de la transferencia celular. La adhesión celular fue inducida a través de la inyección i.p. de LPS o PBS (control negativo) 5 min antes de recuperar las células. Los datos de la gráfica muestran la media del porcentaje de células PKH26⁺ que permanecen en los exudados peritoneales \pm SEM, t-student (n=4 animales por grupo). (B) Detección por microscopía de las células PKH26⁺ adheridas a la membrana peritoneal. Fueron analizados 4 campos diferentes (40x magnificación) del tejido. Los datos se muestran como la media \pm SEM, t-student (n=4 ratones de cada grupo).

4.4. Análisis de la expresión de integrinas en macrófagos.

La firme adhesión de los macrófagos al mesotelio está principalmente mediada por integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ (Bellingan et al., 2002). Decidimos entonces analizar la expresión mediante citometría de algunas de las integrinas en la membrana de los macrófagos peritoneales *cox-2^{+/+}* y *cox-2^{-/-}*.

El análisis por citometría (Figura 25) determinó que no existen diferencias en la expresión en membrana de F4/80, CD29, CD18, CD11b, CD11a y ICAM-1. Sin embargo

conviene recordar que la expresión de CD11c si se encuentra disminuida en los macrófagos *cox-2^{-/-}* (Figura 6).

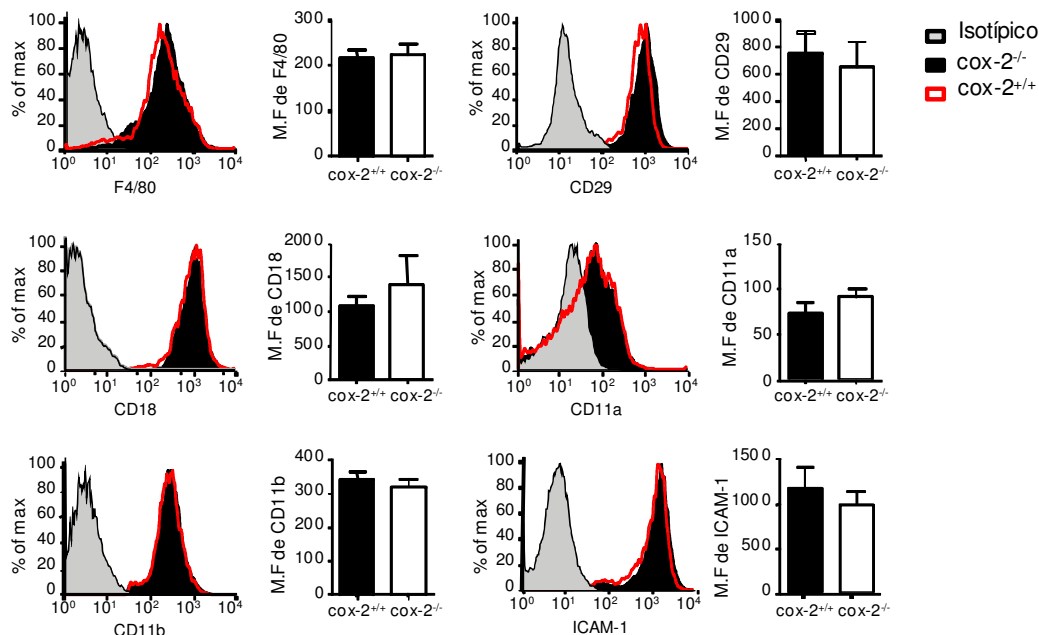


Figura 25. Los macrófagos Cox-2 deficientes no presentan diferencias en la expresión de integrinas de membrana.

Expresión en membrana de las integrinas F4/80, CD29, CD18, CD11a, CD11b e ICAM-1 de macrófagos peritoneales *cox-2^{+/+}* y *cox-2^{-/-}*, analizados por citometría de flujo. Los datos son expresados como la media de fluorescencia de cada integrina \pm SD, t-student (n=8 animales por grupo).

4.5. Papel de Cox-2 en la adhesión celular y reorganización del citoesqueleto de actina.

Con el fin de confirmar la deficiencia en la adhesión de los macrófagos deficientes en Cox-2, analizamos su adhesión *in vitro* a ICAM-1 (1 μ g/ml) o con fibronectina (2 μ g/ml). Como se muestra en la Figura 26.A la capacidad de adhesión tanto a ICAM-1 como a fibronectina se encuentra significativamente reducida en los macrófagos peritoneales *cox-2^{-/-}* en comparación con los macrófagos *cox-2^{+/+}*. Además, la adhesión de los macrófagos *cox-2^{+/+}* a fibronectina fue significativamente menor cuando fueron pre-tratados con el inhibidor de Cox-2 Celecoxib (Figura 26.B). Este hecho confirma que Cox-2 interviene en la adhesión celular.

Tras el anclaje de las integrinas y la firme adhesión celular se requiere posteriormente la polarización del citoesqueleto de actina, el cual es un proceso clave para la migración celular (Vicente-Manzanares et al., 2002).

Estudiamos por tanto la reorganización del citoesqueleto de actina en macrófagos mediante la visualización de adhesiones focales empleando la microscopía confocal. Los filamentos de actina fueron marcados con faloidina unida a AlexaFluor 488. La formación de la adhesión focal fue confirmada a través de la inmunodetección de la vinculina unida a ficoeritrina (PE). Los macrófagos *cox-2^{+/+}* cultivados durante 20 minutos en cubreobjetos cubiertos con fibronectina ([Figura 26.C](#) y [Figura suplementaria 1](#)) muestran una distribución periférica de los filamentos de actina asociada a vinculina en varias adhesiones focales; sin embargo los macrófagos *cox-2^{-/-}* presentan una distribución de los filamentos de actina mas citoplasmática que periférica sin asociarse con la vinculina. Para determinar si los macrófagos deficientes en Cox-2, como respuesta a un menor contacto con la matriz, podrían incrementar la expresión de polímeros de actina, decidimos analizar por citometría la expresión total de faloidina acoplada a AlexaFluor 488 ([Figura 26.D](#)), y observamos que no existen diferencias entre los macrófagos peritoneales *cox-2^{+/+}* y *cox-2^{-/-}*.

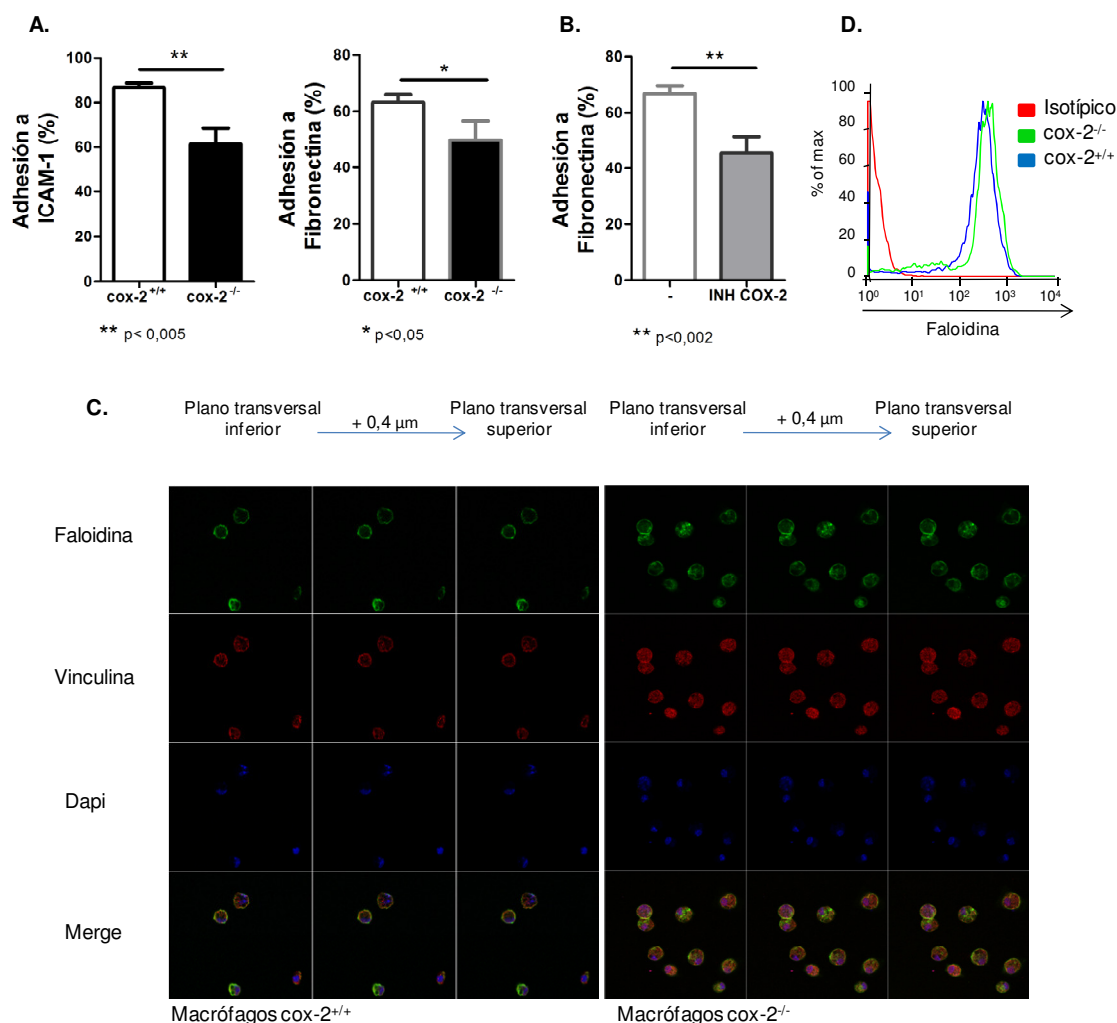


Figura 26. La adhesión celular de las macrófagos *cox-2*^{-/-} es deficiente asociada a alteraciones en la remodelación del citoesqueleto.

(A) Adhesión de macrófagos *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-} a placas cubiertas con ICAM-1 (1 μg/ml) y fibronectina (2 μg/ml). Los datos son expresados como el porcentaje de células adheridas ± SEM, t-student (n=4 animales por grupo y por triplicado). (B) Macrófagos *cox-2*^{+/+} tratados con Celecoxib (100 nM) 1 h antes de su adhesión a fibronectina. (C) Visualización de las adhesiones focales y el citoesqueleto de actina. La adhesión de los macrófagos *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-} se realizó a 37°C durante 30 min. El citoesqueleto de actina fue marcado con faloidina unida al fluoróforo AlexaFluor 488 y la adhesión focal se identificó con un anticuerpo anti-vinculina unido a PE. (D) Análisis de la expresión de faloidina total de los macrófagos *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-} mediante citometría de flujo.

Existen numerosas moléculas involucradas en la formación de adhesiones focales. En cuanto a aquellas proteínas más asociadas a señalizar en membrana (Figura 27.A), como paxilina, vinculina, FAK, sus nivel de expresión no se ven alterados significativamente en

ausencia de Cox-2. La fosforilación de la paxilina a nivel de la tirosina 31 como 118, se produce durante la formación de los contactos focales. La fosfo-paxilina actúa como un interruptor en la regulación de la dinámica de adhesión asociada a las adhesiones focales (Zaidel-Bar et al., 2007). Analizando los niveles de fosfo-paxilina en macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ (Figura 27.B) observamos que en diferentes condiciones de adhesión a ICAM-1 como a fibronectina, o incluso en presencia de la quimioquina Rantes, la ausencia de Cox-2 implica una reducción en los niveles de fosfo-paxilina total en todas las condiciones estudiadas. Por lo tanto la dinámica de la formación de contactos focales se encuentra alterada en macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$.

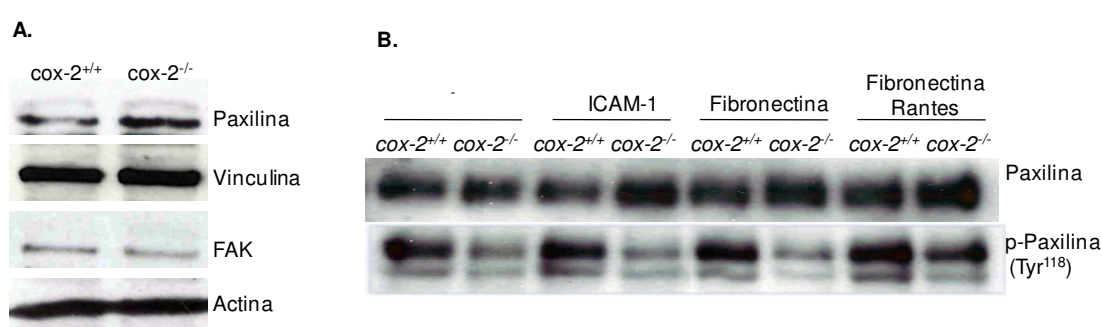


Figura 27. Estudio de algunas de las proteínas involucradas en la formación de las adhesiones focales.

(A) Análisis por inmunotransferencia de la expresión de Paxilina, Vinculina, Quinasa de adhesión focal (FAK) y actina de macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$. (B) Estudio de la fosforilación de Paxilina en diferentes condiciones de adhesión a ICAM-1 (1 $\mu\text{g/ml}$) y fibronectina (2 $\mu\text{g/ml}$), o de migración con Rantes (10 ng/ml) durante 90 minutos, de los macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ y $\text{cox-2}^{-/-}$ mediante Western Blot.

4.6. La deficiencia en Cox-2 altera la señalización dependiente de PI3K.

Los bajos niveles de fosfo-paxilina en los macrófagos $\text{cox-2}^{-/-}$ sugiere que la activación de la señalización celular que conduce a la adhesión puede estar alterada en ausencia de Cox-2. Por lo tanto quisimos estudiar cómo se encuentra el estado de algunas de las moléculas claves de la señalización mediada por integrinas. Las integrinas $\beta 2$ son conocidas por activar múltiples cascadas de señalización necesarias para la migración y adhesión de los macrófagos, incluyendo ERK1/2, JNK y PI3K (Imhof & Aurrand-Lions, 2004; Worthylake & Burridge, 2001). Decidimos analizar la señalización celular en presencia o ausencia de la quimioquina Rantes durante 90 minutos antes de proceder al

lisado celular (Figura 28.A). Como podemos observar la quimioquina Rantes incrementa la expresión de la forma fosforilada de JNK y de AKT. Es interesante recalcar que los macrófagos *cox-2^{-/-}* presentan una menor expresión de la forma fosforilada de AKT, en comparación con los macrófagos *cox-2^{+/+}*. Con el fin de verificar si los niveles bajos de fosfo-AKT en macrófagos *cox-2^{-/-}* conducen a un efecto más generalizado en proteínas que actúan posteriormente en la ruta de señalización mediada por AKT, analizamos el estado de activación de las GTPasas involucradas en la adhesión y migración como Rac-1 y Cdc42 (Figura 28.B). Para estudiar su expresión realizamos un “pull down” tras mantener las células en adhesión a fibronectina y en presencia de la quimioquina Rantes durante 2 horas y empleando el dominio de unión p21 (PBD) de PAK. Los resultados del “pull down” muestran que la expresión de las formas activas de Rac1 y de Cdc42 en macrófagos *cox-2^{-/-}* fue casi indetectable en comparación con los *cox-2^{+/+}*.

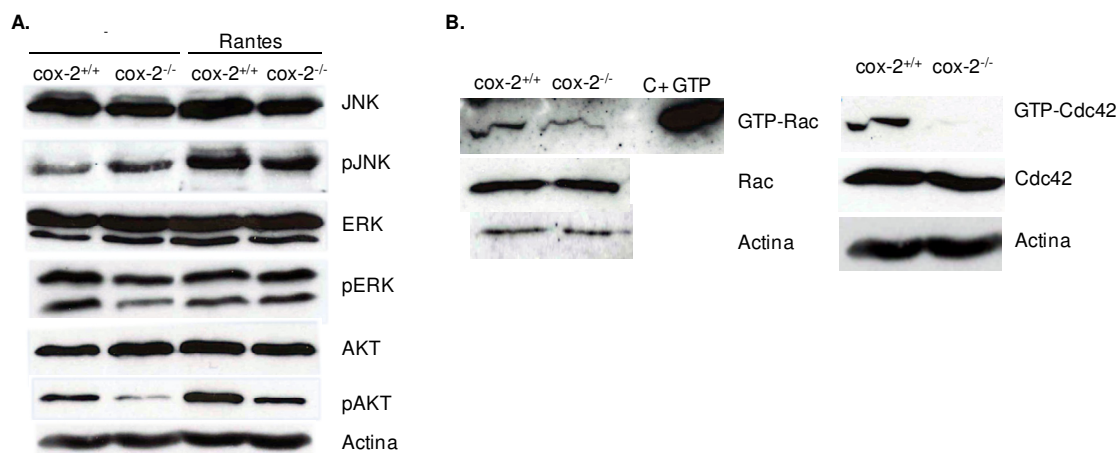


Figura 28. La señalización celular mediada por Rantes está alterada en ratones deficientes en Cox-2.

(A) Análisis por inmunotransferencia de la fosforilación de las proteínas JNK, ERK1/2 y AKT en macrófagos *cox-2^{+/+}* y *cox-2^{-/-}*. Los macrófagos fueron adheridos a placa con y sin presencia de la quimioquina Rantes durante 90 minutos antes de proceder al lisado celular. (B) La activación de Rac-1 y de Cdc42 está alterada en macrófagos *cox-2^{-/-}*. Se realizó un “pull down” de las proteínas Rac y Cdc42 usando bolas unidas al dominio de unión p21 de la quinasa de activación p21 (Pak) de Rac y Cdc42.

El hecho de que fosfo AKT se encuentre reducido tanto en condiciones basales como en presencia de quimioquina sugiere un defecto más fundamental en la señalización mediada por las PI3Ks (PI3Kinasas). Los niveles de la subunidad reguladora p85 y p101 PI3K como a su vez las subunidades catalítica p110 γ y p110 δ , han sido anteriormente

descritas como las moléculas clave en la migración de leucocitos (Hirsch et al., 2000; Liu et al., 2007a). Analizamos mediante inmunotransferencia (Figura 29) los niveles de expresión de las subunidades catalíticas y reguladoras de las PI3K en diferentes condiciones de adhesión a ICAM-1 en presencia o ausencia de Rantes y en condiciones basales. Los resultados muestran que la expresión de p85, p101 y p110 δ PI3K se expresan igualmente en macrófagos peritoneales *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-}, mientras que la expresión de la subunidad p110 γ PI3K fue significativamente reducida en macrófagos *cox-2*^{-/-} tanto en adhesión basal, a ICAM-1 y en presencia o ausencia de Rantes.

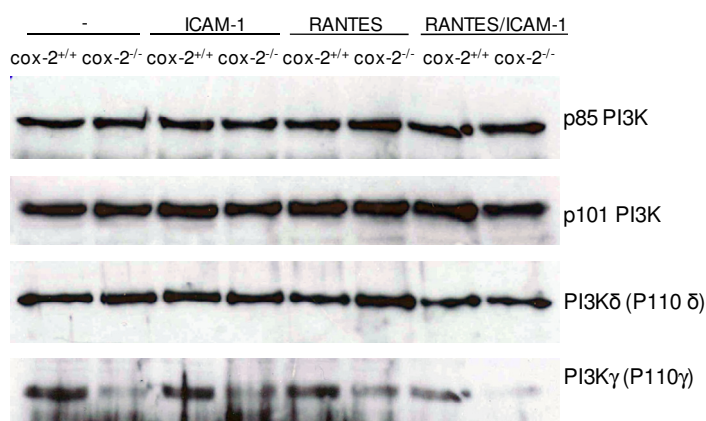


Figura 29. La expresión de la subunidad p110 γ PI3K está disminuida en los macrófagos deficientes en Cox-2.

Análisis por Western Blot de los niveles de proteína de las diferentes subunidades de PI3K, p85, p101, p110 δ y p110 γ de los macrófagos *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-} en condiciones de adhesión a ICAM-1 y en presencia de la quimioquina Rantes durante 90 minutos.

4.7. Cox-2 tiene un papel clave en la migración de los macrófagos mediada por PI3Ks.

Se ha demostrado que la señalización de las PI3Ks, p110 γ y p110 δ , es clave para la regulación de la migración de células inmunes. En particular los ratones p110 γ ^{-/-} presentan un defecto en la acumulación de macrófagos en modelos de peritonitis. Ello es debido a una reducida migración de los macrófagos en respuesta a diferentes quimioquinas (Hirsch et al., 2000). Por tanto decidimos realizar ensayos de adhesión a ICAM-1 de macrófagos peritoneales *cox-2*^{+/+}, y ensayos de migración en respuesta a quimioquina, inhibiendo la actividad de la subunidad p110 γ PI3K con el inhibidor

específico LY284002, como de todas las subunidades de PI3Ks mediante el inhibidor AS252424 (Figura 30).

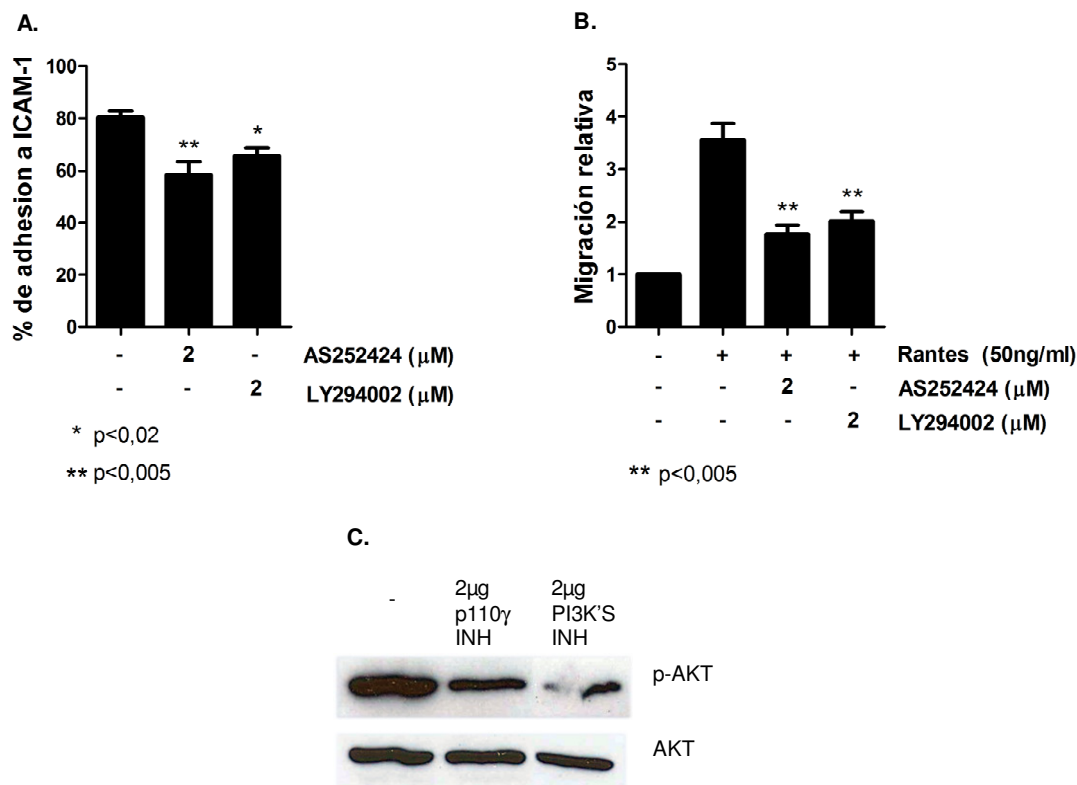


Figura 30. Implicación de la PI3K γ en la migración de macrófagos.

(A) Los inhibidores PI3K no-específicos (LY294002) y los inhibidores selectivos para la subunidad p110 γ (AS252424), reducen la adhesión a ICAM-1 de los macrófagos. Los datos son expresados como el porcentaje de células adheridas \pm SEM, t-student (n=3 animales por triplicado). (B) La migración de macrófagos a Rantes se encuentra regulada por la subunidad p110 γ PI3K. Los macrófagos cox-2^{+/+} fueron preincubados con 2 μ M de LY294002 y AS252424 durante 30 minutos antes de inducir la migración a Rantes (50 ng/ml). Los datos se muestran como migración relativa (n° células con quimioquina/n° células control), t-student (n=3 animales por triplicado). (C) Estudio del efecto de los inhibidores LY294002 y AS252424 en la expresión de pAKT, mediante Western Blot en macrófagos peritoneales.

Como se refleja en la Figura 30.A tratamientos con ambos tipos de inhibidores disminuye la adhesión de los macrófagos peritoneales a ICAM-1. Por otro lado el empleo de los inhibidores específicos de p110 γ e inhibidores genéricos de las PI3Ks bloquean la migración dependiente de la quimioquina Rantes de los macrófagos peritoneales (Figura

30.B) asociado a una inhibición de la actividad de AKT (Figura 30.C). El empleo de los inhibidores no afectó a la supervivencia celular (datos no mostrados).

La actividad de Cox-2 induce la producción de PGE₂ que ha sido implicada en migración de células inmunes (Gosset et al., 2005). En primer lugar quisimos conocer qué efecto presenta PGE₂ en la expresión de PI3K p110γ y por tanto su posterior efecto en la migración mediada por quimioquinas. (Figura 31).

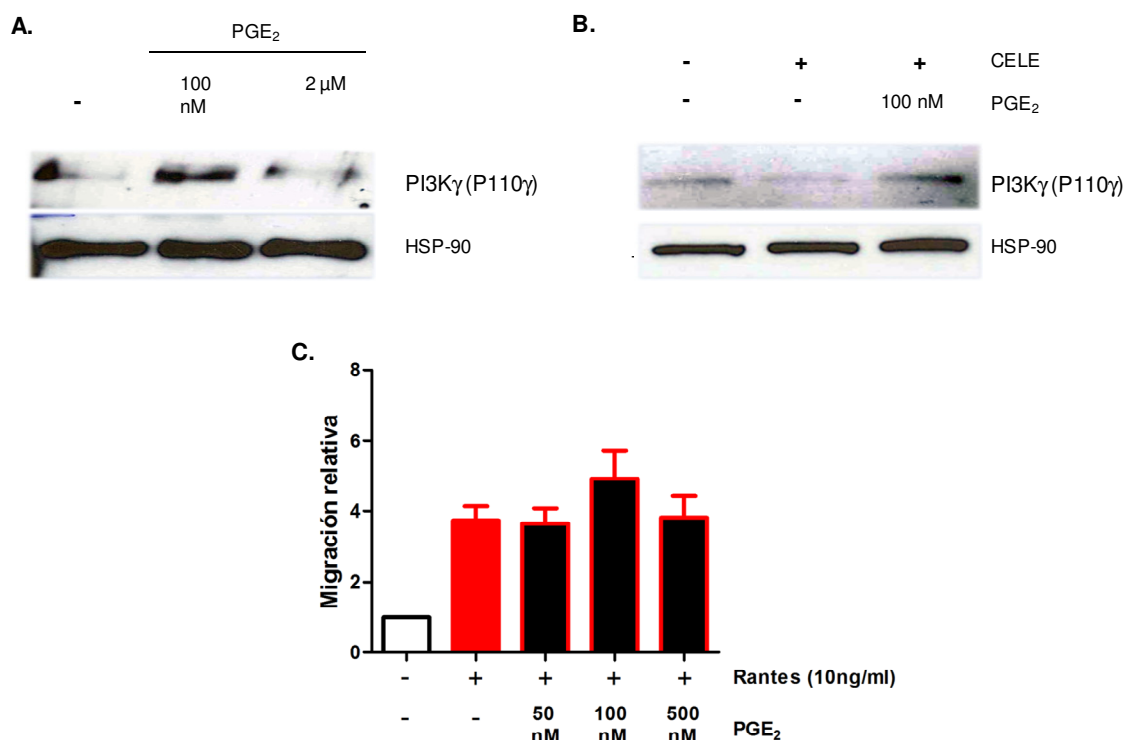


Figura 31. Bajas concentraciones de PGE₂ incrementan la expresión de la subunidad p110γ PI3K, y un incremento en la migración mediada por la quimioquina Rantes.

(A) Análisis por inmunotransferencia del efecto de diferentes concentraciones de PGE₂ en la expresión de la subunidades de PI3K p110γ de macrófagos peritoneales cox-2^{+/+} en condiciones de adhesión a ICAM-1 durante 90 minutos. (B) Análisis por Western Blot de los niveles de proteína de la subunidad PI3K p110γ de macrófagos cox-2^{+/+} en condiciones de adhesión a ICAM-1 durante 90 minutos y pre-tratados 1 h antes con celecoxib (100nM). (C) Efecto de PGE₂ en las migraciones *in vitro* de macrófagos peritoneales cox-2^{+/+} en respuesta a la quimioquina Rantes. Los macrófagos peritoneales de ratones cox-2^{+/+} y cox-2^{-/-} fueron cultivados a migrar en respuesta a Rantes durante 24 h y tratados a la vez con diferentes concentraciones de PGE₂ en cámaras Trans-well de 8 μm de diámetro de poro. Los resultados obtenidos con células de 3 ratones, analizados independientemente, se muestran como migración relativa (Nº de células con Quimioquina/ Nº de células control) ± SD, t-student.

Para ello tratamos a los macrófagos peritoneales $\text{cox-2}^{+/+}$ adheridos a ICAM-1, con diferentes concentraciones de PGE_2 durante 90 minutos tras lo cual se lisaron las células y se analizó la expresión de la subunidad $\text{p110}\gamma$ PI3K por inmunotransferencia. Como muestra la [Figura 31.A](#) bajas concentraciones de PGE_2 incrementan la expresión de $\text{p110}\gamma$ PI3K en comparación con altas concentraciones. Por otro lado la inhibición de la producción de PGE_2 mediante el empleo de inhibidores de la actividad de Cox-2, Celecoxib ([Figura 31.B](#)), muestran una reducción en la expresión de $\text{p110}\gamma$ PI3K, que se revierte con PGE_2 exógena en bajas concentraciones. Para corroborar el papel que tiene PGE_2 en la migración celular mediada por la actividad de las PI3K, realizamos una migración *in vitro* de los macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ en respuesta a la quimioquina Rantes tratados con diferentes concentraciones de la prostaglandina ([Figura 31.C](#)). Así observamos que a una concentración de 100 nM PGE_2 incrementa la migración de los macrófagos peritoneales.

Estos resultados apoyan la teoría de que Cox-2 es clave en la migración y adhesión de los macrófagos peritoneales y que su ruta de actuación se relaciona con la actividad de las PI3Ks a nivel de la subunidad catalítica $\text{p110}\gamma$.

5. Efecto de las prostaglandinas en la migración y adhesión de macrófagos peritoneales.

La síntesis de prostaglandinas mediada por la actividad enzimática de Cox-2, presentan un papel importante en la migración de diferentes tipos celulares al foco de inflamación. En concreto $\text{PGF}_{2\alpha}$ es capaz de inducir la migración de neutrófilos (Gosset et al., 2005; Wallace et al., 2009), y por otro lado la síntesis de PGE_2 modula la respuesta de los monocitos a quimioquinas (Hoggatt et al., 2009; Panzer & Uguccioni, 2004).

5.1. Papel de PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ en la migración de macrófagos.

Debido al papel que presenta Cox-2 en la migración de macrófagos, analizamos el efecto de las prostaglandinas individualmente. Para ello realizamos migraciones *in vitro*, mediante el uso de cámaras Trans-well, de los macrófagos $\text{cox-2}^{+/+}$ en respuesta a

diferentes quimioquinas tratados a su vez en la parte superior del “trans-well” con distintas concentraciones de la prostaglandina PGE₂ (Figura 32.A).

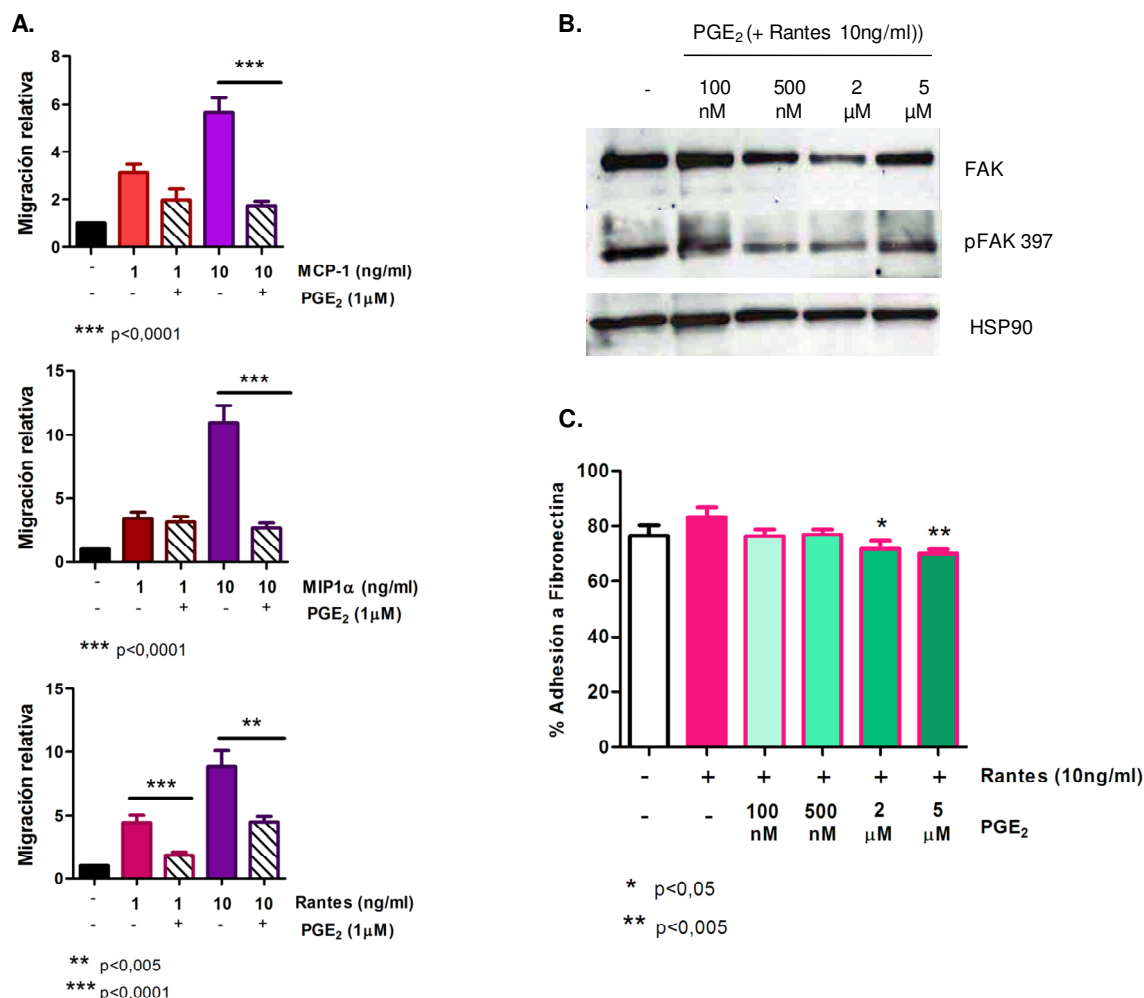


Figura 32. Elevadas concentraciones de PGE₂ reducen la migración en respuesta a quimioquinas.

(A) Efecto de PGE₂ en la migración *in vitro* de macrófagos peritoneales *cox-2^{+/+}* en respuesta a distintas quimioquinas. Los macrófagos peritoneales de ratones *cox-2^{+/+}* fueron cultivados a migrar en respuesta a MIP-1α, Rantes y MCP-1 durante 24 h y tratados a la vez con PGE₂ 1 μM en cámaras Trans-well de 8 μm de diámetro de poro. Los resultados obtenidos con células de 3 ratones, analizados independientemente, se muestran como migración relativa (Nº de células con Quimioquina/ Nº de células control) ± SD, t-student (B) Reducción de la fosforilación de FAK por PGE₂, en presencia de quimioquinas analizada mediante Western Blot. Los macrófagos fueron pre-tratados durante 24 h con las diferentes concentraciones de PGE₂ y después de 1 h con la quimioquina se procedió al lisado celular. (C) Adhesión a placas cubiertas con fibronectina de macrófagos peritoneales *cox-2^{+/+}*, pre-tratados con diferentes concentraciones de PGE₂ durante 24 h y en presencia de la quimioquina Rantes. Los datos son expresados como el porcentaje de células adheridas ± SEM, t-student (n=3 animales por triplicado).

PGE₂ en dosis altas de 1 μ M produjo un descenso significativo de la migración en respuesta a las quimioquinas MCP-1, MIP1 α y Rantes. Por otro lado tratamos a los macrófagos peritoneales *cox-2*^{+/+} con diferentes dosis de la prostaglandina PGE₂ durante 24 horas. Tras 1 hora de estimulación con la quimioquina Rantes se procedió al lisado celular para posteriormente analizar la expresión de FAK y su forma fosforilada por inmunotransferencia (Figura 32.B). Se observó que a medida que se van incrementando las dosis de la PGE₂ en presencia de Rantes se disminuye la expresión de FAK y de pFAK. A su vez quisimos ver el efecto de esas concentraciones de PGE₂ en la adhesión de los macrófagos peritoneales *cox-2*^{+/+} a fibronectina y en presencia al mismo tiempo de la quimioquina Rantes (Figura 32.C). Una vez que los macrófagos fueron tratados durante 24 horas con las distintas concentraciones de PGE₂, fueron sometidos a adhesión a fibronectina durante 20 minutos en presencia de la quimioquina. A medida que se incrementaron las dosis de PGE₂ se produce una reducción ligera pero significativa de la adhesión de los macrófagos a fibronectina en presencia de Rantes. Por tanto esto explicaría una menor migración que puede ser debida a una expresión reducida de FAK (proteína implicada en la formación de los contactos focales) a concentraciones elevadas de PGE₂.

A la vez que estudiamos el efecto de PGE₂, también analizamos el efecto de PGF_{2 α} en la migración a distintas quimioquinas. Como se puede observar en la Figura 33.A, concentraciones elevadas de PGF_{2 α} no alteran significativamente la migración en respuesta a las quimioquinas MCP-1, Rantes y MIP1 α .

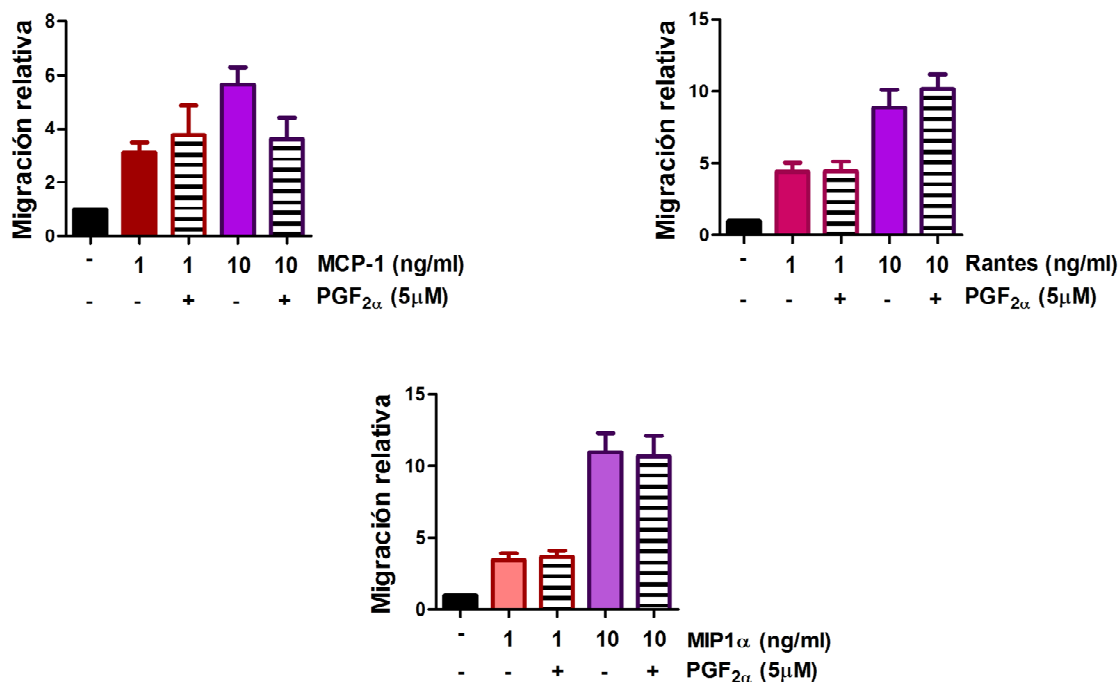


Figura 33. Efecto de PGF_{2α} en la migración de macrófagos en respuesta a quimioquina.

Los macrófagos peritoneales de ratones *cox-2^{+/+}* fueron cultivados y sometidos a 24 h de migración en repuesta a MCP-1, Rantes y MIP1α y tratados al mismo tiempo con la prostaglandina PGF_{2α} 5 μM en cámaras de migración Trans-well de 8 μm de diámetro de poro. Los resultados se muestran como Migración relativa (Nº de células con quimioquina/ Nº de células control) ± SD, t-student (n=3 ratones analizados independientemente).

El efecto inhibitor que presentan altas concentraciones de PGE₂ en reducir la migración a quimioquinas, puede deberse a una alteración de los receptores EPs de la prostaglandina, lo que puede implicar una menor señalización de la prostaglandina y por tanto una menor migración. Para comprobarlo analizamos mediante inmunotransferencia la expresión de los receptores de la prostaglandina PGE₂, EP1, EP2, EP3 y EP4 en macrófagos *cox-2^{+/+}* tratados durante 24 horas con concentraciones elevadas de PGE₂. Como se observa en la [Figura 34](#), tratamientos de altas concentraciones de PGE₂ no modifican la expresión de sus receptores de membrana.

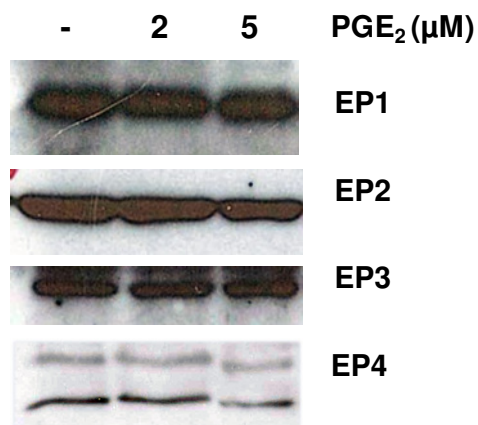


Figura 34. Tratamientos con PGE₂ no modifican la expresión de receptores de prostaglandina.

Análisis por inmunotransferencia de la expresión de los receptores EPs en macrófagos *cox-2^{+/+}*, pre-tratados con diferentes concentraciones de PGE₂ durante 24 h.

5.2. Papel de las prostaglandinas PGE₂ y PGF_{2α} en la expresión de integrinas de membrana.

Debido a que la migración de los macrófagos peritoneales mediada por quimioquinas se encuentra reducida por PGE₂ a concentraciones elevadas sin verse afectada la expresión de los receptores EP, decidimos analizar la expresión de diferentes integrinas de membrana implicadas en la migración celular por citometría de flujo. Una vez extraídos los macrófagos peritoneales *cox-2^{+/+}* tras la inducción de una peritonitis producida por tratamientos con tioglicolato, los estimulamos durante 24 horas con concentraciones crecientes de PGE₂ y de PGF_{2α}, y analizamos por citometría la expresión de las integrinas CD11a, CD18, CD29, ICAM-1 y CD11c en membrana (Figura 35). Como podemos observar en la Figura 35.A tratamientos con PGE₂ a 1 μM producen una reducción significativa de las integrinas CD11a, ICAM-1 y CD11c, mientras que el resto de las integrinas sólo se ven afectadas cuando empleamos concentraciones mucho más elevadas. Mientras que tratamientos con PGF_{2α} a cualquiera de las concentraciones elegidas no alteraron la expresión en membrana de ninguna de las integrinas de estudio (Figura 35.B). Para determinar que el efecto de PGE₂ no es únicamente a nivel de membrana decidimos analizar la expresión de la integrina CD11c mediante inmunotransferencia (Figura 35.C) observándose también una reducción de los niveles celulares de CD11c.

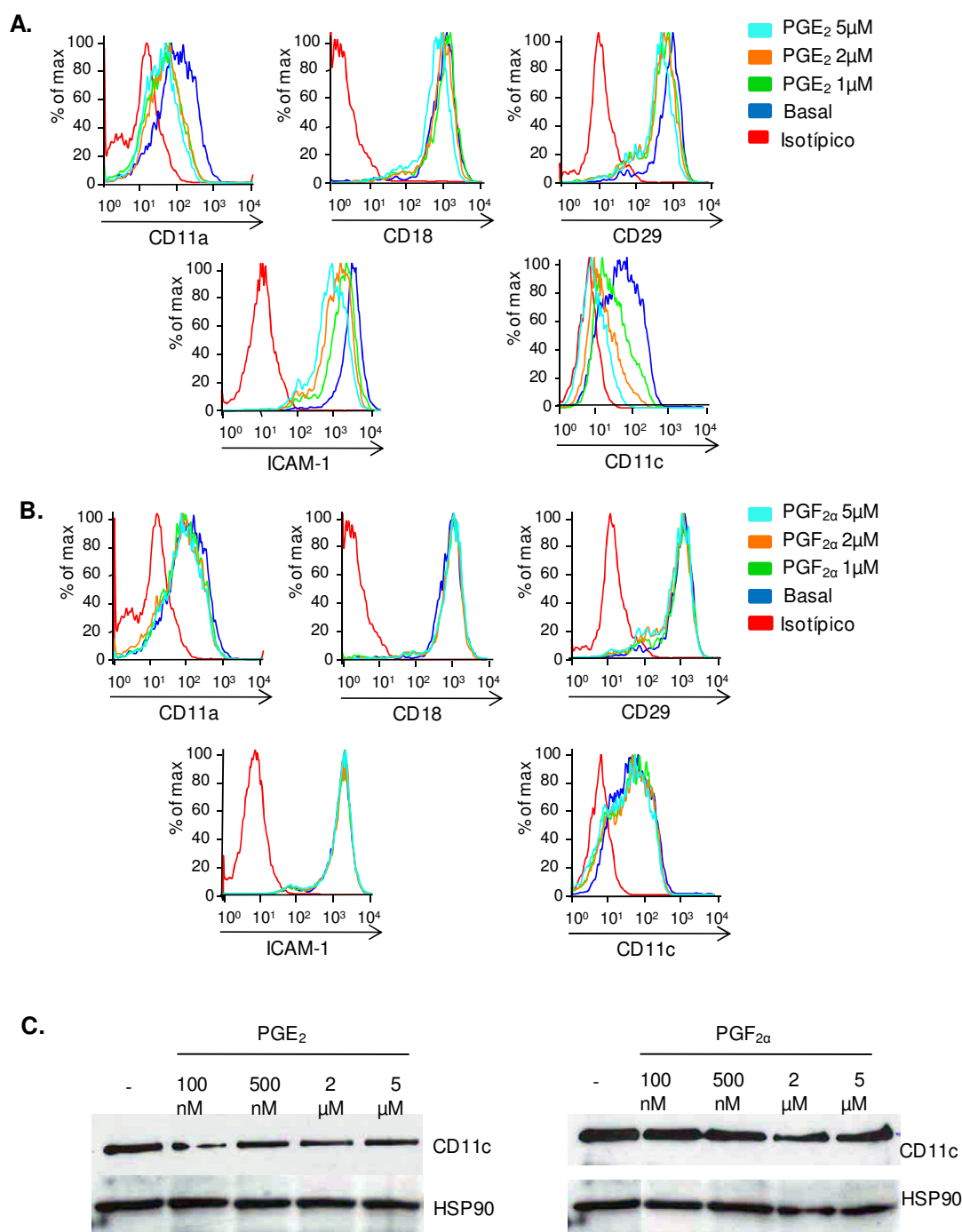


Figura 35. PGE₂ pero no PGF_{2α} reduce la expresión en membrana de algunas integrinas.

(A) Expresión en membrana de diferentes integrinas de macrófagos *cox-2^{+/+}*, pre-tratados con diferentes concentraciones de PGE₂ durante 24 h y analizado por citometría flujo. (B) Expresión en membrana de diferentes integrinas CD11a, CD18, CD29, ICAM-1 y CD11c de macrófagos *cox-2^{+/+}* pre-tratados con diferentes concentraciones de PGF_{2α}. (C) Análisis por inmunotransferencia del efecto de PGE₂ y PGF_{2α} en la expresión de CD11c a nivel de proteína total. Los macrófagos fueron tratados con las diferentes concentraciones de prostaglandinas durante 24 h.

5.3. Efecto de las PGs en la migración *in vivo* de células mieloides.

Para corroborar todos los resultados obtenidos *in vitro*, decidimos llevar a cabo un modelo *in vivo* a través del cual nos permitiera estudiar el efecto de las prostaglandinas en la migración de células inmunes. Para ello inyectamos i.p. LPS a ratones *cox-2^{+/+}*. Pasadas 3 horas se inyectaron i.p. PGE₂ y PGF_{2α}. Tres horas más tarde realizamos lavados peritoneales con PBS frío y analizamos las poblaciones CD11b⁺ que migran a la cavidad peritoneal. Según se muestra en la [Figura 36](#), tratamientos con LPS incrementan la migración de células CD11b⁺ a la cavidad peritoneal. Tal incremento se ve reducido por el efecto de PGE₂. En cambio no se observan diferencias con tratamientos con PGF_{2α}. Se corrobora así que altas concentraciones de PGE₂ reducen la migración en respuesta a estímulos inflamatorios como pueden ser diferentes quimioquinas o LPS.

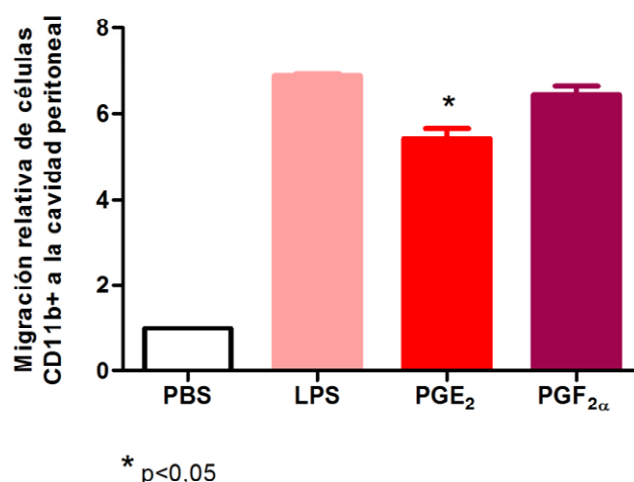


Figura 36. PGE₂ reduce la migración *in vivo* de células CD11b⁺ a la cavidad peritoneal.

Se realizaron inyecciones i.p. de LPS (25 mg/kilogramo de animal) diluido en 1 ml de PBS, en ratones *cox-2^{+/+}*. Pasadas 3 h se procedió a la inyección i.p. de PGE₂ (5 μM) y PGF_{2α} (5 μM) en PBS. Después de 3 h las células recuperadas de la cavidad peritoneal fueron marcadas con el anticuerpo CD11b marcado con alexa 647. Los resultados muestran la migración de células CD11b⁺ relativizados al control sólo con PBS, t-student (n= 3 animales).

5.4. Papel de PGE₂ y PGF_{2α} en la adhesión de macrófagos

Posteriormente analizamos el posible efecto de PGE₂ y PGF_{2α} en procesos de adhesión. Para ello analizamos la adhesión de los macrófagos peritoneales *cox-2^{+/+}* pre-tratados durante 24 horas con diferentes concentraciones de PGE₂ y PGF_{2α} en placas recubiertas con fibronectina. En la [Figura 37.A](#) podemos ver que a altas concentraciones

de PGE₂ se produce un incremento significativo en la adhesión de los macrófagos a fibronectina mientras que no se observa ningún efecto con tratamientos con PGF_{2α} (Figura 37.B). Este resultado indica que PGE₂ actúa de manera opuesta en procesos de migración como en procesos de adhesión.

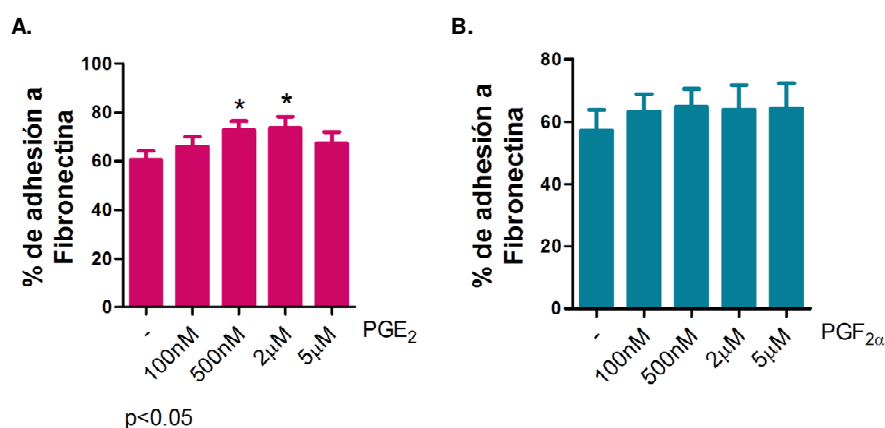


Figura 37. PGE₂ incrementa la adhesión de los macrófagos a concentraciones elevadas.

(A) Adhesión a placas cubiertas con fibronectina de macrófagos peritoneales *cox-2^{+/+}*, pre-tratados con diferentes concentraciones de PGE₂ durante 24 h. Los datos son expresados como el porcentaje de células adheridas \pm SEM, t-student (n=4 animales por triplicado). (B) Adhesión de macrófagos *cox-2^{+/+}* a placas cubiertas con fibronectina y pre-tratados con distintas concentraciones de PGF_{2α} durante 24 h.

5.5. Papel de las PGs en la formación de contactos focales.

Una parte del proceso de adhesión celular implica cambios morfológicos del citoesqueleto de actina al entrar en contacto diferentes integrinas con elementos específicos de la matriz extracelular. En primer lugar decidimos determinar el efecto de distintas concentraciones de PGE₂ y de PGF_{2α} en la expresión de FAK y pFAK en macrófagos peritoneales *cox-2^{+/+}* pre-tratados con las prostaglandinas durante 24 horas. Como podemos observar en la Figura 38.A PGE₂ en altas concentraciones incrementó la expresión de FAK y su forma fosforilada mientras que PGF_{2α} reduce su expresión (Figura 38.B). Como hemos observado anteriormente esto no implica ningún efecto en su adhesión. Por otro lado el estudio del citoesqueleto de actina realizado en macrófagos peritoneales *cox-2^{+/+}* mediante el análisis de faloidina conjugada con Alexa488 por microscopía (Figura 38.Cy Figura suplementaria 2) muestra que tratamientos con PGE₂

favorecen la reorganización del citoesqueleto de actina hacia la periferia clave para la formación de contactos focales.

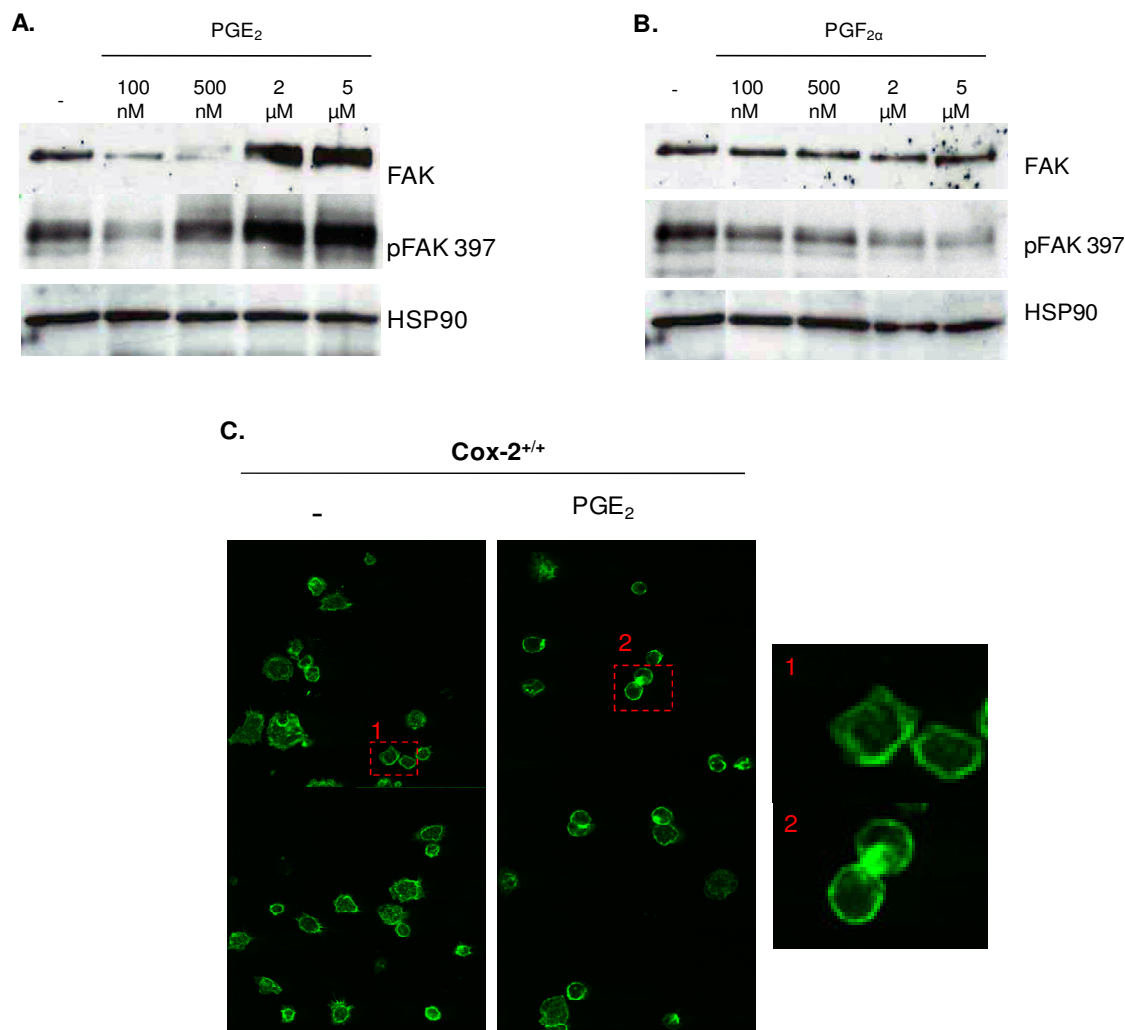


Figura 38: PGE_2 en condiciones de adhesión incrementa la expresión de la forma fosforilada de FAK y la reorganización del citoesqueleto de actina.

(A) Inducción de la fosforilación de FAK por PGE_2 , analizada mediante Western Blot. Los macrófagos fueron pre-tratados durante 24 h con las diferentes concentraciones de PGE_2 . (B) Análisis del efecto de $PGF_{2\alpha}$ en la fosforilación de FAK. (C) Efecto de PGE_2 (2 μ M) en la reorganización del citoesqueleto de actina en macrófagos peritoneales $cox-2^{+/+}$ analizado por microscopía confocal.

5.6. PGE₂ revierte el defecto en adhesión de los macrófagos deficientes en Cox-2.

Uno de nuestros objetivos principales era saber si podríamos revertir el defecto que presentan los macrófagos *cox-2*^{-/-} en la adhesión con tratamientos con la prostaglandina PGE₂ (Figura 39). Para ello primero analizamos la adhesión de los macrófagos *cox-2*^{+/+} a fibronectina pre-tratados con LPS, PGE₂ e inhibidores de Cox-2 añadidos 1 hora antes de los tratamientos anteriores. Como se muestra en la Figura 39.A tratamientos con LPS incrementan la adhesión a fibronectina y revierten la adhesión reducida de las muestras tratadas con el inhibidor de Cox-2. Al estudiar la adhesión a ICAM-1 de macrófagos *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-} pre-tratados durante 24 horas con PGE₂ (Figura 39.B) observamos de los macrófagos *cox-2*^{-/-} tratados con PGE₂ lograban restaurar la adhesión basal reducida en comparación con los *cox-2*^{+/+}. El efecto de la PGE₂ en revertir la adhesión de los macrófagos *cox-2*^{-/-} no se debe a diferencias en la producción basal de PGE₂ medida por ELISA (Figura 39.C). Tampoco es debido a diferencias en la expresión de los receptores de PGE₂ analizadas mediante inmunotransferencia (Figura 39.D). Lo que si observamos es que tratamientos con PGE₂ mejoran la reorganización del citoesqueleto de actina hacia una distribución más periférica en los macrófagos peritoneales *cox-2*^{-/-} (Figura 39.E y Figura suplementaria 2).

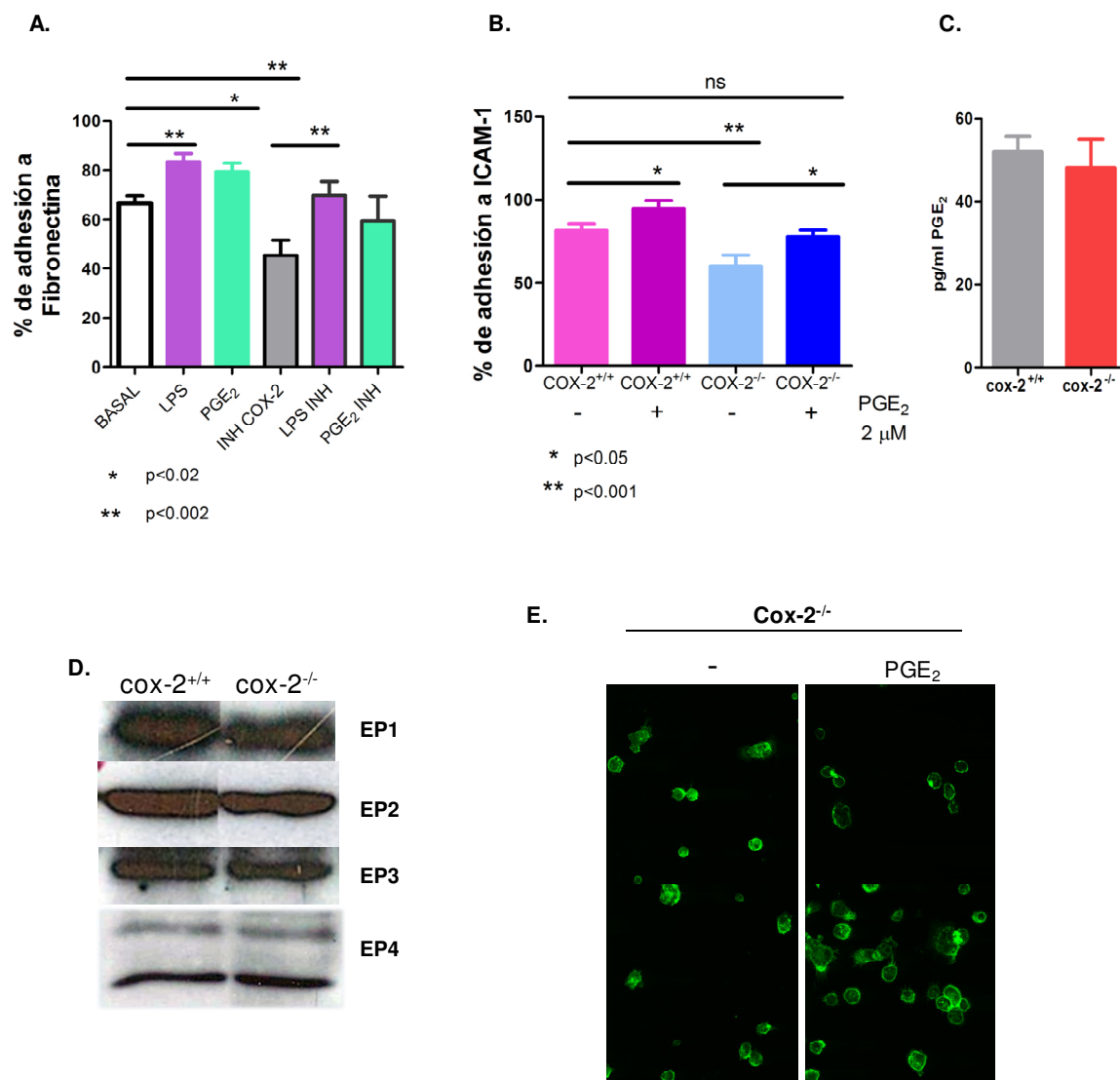


Figura 39. PGE₂ revierte la deficiencia de adhesión de los macrófagos cox-2^{-/-}.

(A) Adhesión a placas cubiertas con fibronectina de macrófagos peritoneales cox-2^{+/+}, pre-tratados con LPS y PGE₂ durante 24 h y con inhibidores específicos de Cox-2, 1 h antes de los diferentes tratamientos posteriores. Datos expresados como el porcentaje de células adheridas \pm SEM, t-student (n=3 animales por triplicado). (B) Adhesión de macrófagos cox-2^{+/+} y cox-2^{-/-} a placas cubiertas con ICAM-1 pre-tratados con PGE₂ 2 μM, durante 24 h. Datos expresados como el porcentaje de células adheridas \pm SEM, t-student (n=4 animales de cada grupo y por triplicado). (C) Producción basal de PGE₂ en macrófagos peritoneales cox-2^{+/+} y cox-2^{-/-}, cuantificada por ELISA, t-student (n=8 animales por grupo). (D) Estudio de la expresión de los receptores EPs en macrófagos peritoneales cox-2^{+/+} y cox-2^{-/-}, analizados por Western Blot. (E) Efecto de PGE₂ (2 μM) en la reorganización del citoesqueleto de actina en macrófagos peritoneales cox-2^{-/-} analizado por microscopía confocal.

Discusión

Implicación de Cox-2 en la respuesta inflamatoria y en el proceso de diferenciación y maduración de los macrófagos.

En este trabajo se ha intentado profundizar en el papel que tiene Cox-2 y la consecuente producción de prostaglandinas en la diferenciación, activación y migración de los macrófagos en respuesta a diferentes estímulos inflamatorios.

La migración de los leucocitos al tejido inflamado es un mecanismo clave durante la inflamación (Langer & Chavakis, 2009; Ley et al., 2007). Estudios previos han descrito que la producción de PGs a partir de la actividad enzimática de Cox-1 y Cox-2 pueden modular la migración de leucocitos (Choi et al., 2010); así los animales deficientes en Cox-2 como en mPGES-1, muestran un reducido reclutamiento celular en los focos de inflamación (Dinchuk et al., 1995; Kamei et al., 2004). Sin embargo, ninguno de estos estudios abordó el tipo de célula afectada o el mecanismo involucrado en la deficiente migración leucocitaria en ausencia de ambas enzimas. Usando un modelo de peritonitis inducida por tratamientos con tioglicolato, nuestros resultados muestran una reducción significativa en el número total de células que migran a la cavidad peritoneal de ratones *cox-2^{-/-}*, corroborando los hallazgos anteriormente descritos. Cabe destacar que en nuestro modelo el tipo celular que presenta una menor respuesta al estímulo inflamatorio en ausencia de Cox-2, son las células de naturaleza mieloide CD11b⁺, F4/80⁺ y CD11c⁺, sin verse alterada la respuesta de las células T, las células B, NK y granulocitos.

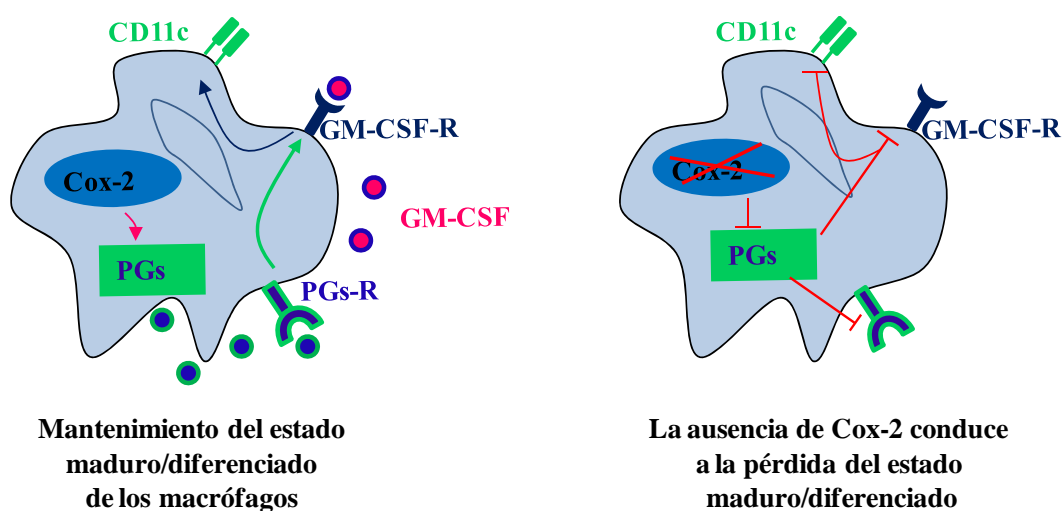
Actualmente existe controversia a la hora de diferenciar los fenotipos de células dendríticas y otros tipos mieloides como los macrófagos (Ghosn et al., 2010; Gordon, 2003; Ishii et al., 2009; Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2008). Así poblaciones CD11b⁺ han sido tradicionalmente definidas como macrófagos peritoneales. Según nuestros datos alrededor de un 90% de estas células son también F4/80⁺, marcador considerado específico de macrófagos. El dilema surge con el marcador CD11c. Recientemente, se ha descrito una subpoblación de monocitos CD11c⁺ que juega un papel importante en aterosclerosis (Wu et al., 2009) y que se consideran precursores de depósitos de macrófagos en la placa de ateroma, los cuales tienen la capacidad de migrar a los nódulos linfáticos durante la regresión de la aterosclerosis (Randolph, 2008). Además se ha descrito que CD11c es necesario para la trans migración de los monocitos a través de endotelio (Wu et al., 2009). En nuestro modelo se observa que las poblaciones CD11b⁺ y CD11c⁺ que migran al peritoneo son ambas F4/80⁺, lo que indica una única población mieloide CD11b⁺, CD11c⁺ y F4/80⁺. Por otro lado existen diferentes estudios

que demuestran que poblaciones de células dendríticas inmaduras tratadas con LPS incrementan la expresión de MHCII (Brandt et al., 2003; Kamon et al., 2006; Stables et al., 2011), y del receptor de CCR7 necesario para su migración a los nódulos linfáticos. En nuestra población de estudio se observa que tratamientos con LPS no incrementan la expresión de MHCII, ni tampoco existe expresión del receptor CCR7, lo que sugiere que CD11c podría ser considerado como un marcador de un subtipo celular mielóide intermedio con rasgos característicos de macrófagos pero también de células dendríticas.

La expresión de la integrina CD11c, es regulada durante la activación y diferenciación de progenitores de células mieloides (Corbi & Lopez-Rodriguez, 1997). El heterodímero CD18/CD11c presente en monocitos diferenciados media la invasión del endotelio vascular en los lugares de inflamación a través de la interacción con ICAM-1 (Shelley et al., 2002). Sabemos que los monocitos incrementan la expresión de CD11c durante la hipercolesterolemia, teniendo un papel importante en el reclutamiento de los monocitos y en el desarrollo de la aterosclerosis (Wu et al., 2009). Diferentes poblaciones de monocitos persisten en los lugares de inflamación, utilizando ambas integrinas CD11b y CD11c para migrar al tejido y amplificar la respuesta inflamatoria (Weber et al., 1999). La deficiencia de Cox-2 en los macrófagos peritoneales está asociada no solo a una menor migración al peritoneo sino también presenta unos niveles en la expresión de CD11c reducidos. Esto sugiere que CD11c es una de las moléculas clave durante la respuesta inflamatoria de los macrófagos al igual que Cox-2.

La expresión de los genes específicos del linaje mielóide CD11b (Springer et al., 1979) y CD11c (Springer et al., 1986), presentan un incremento en la transcripción durante la diferenciación de diferentes líneas celulares mieloides (Noti & Reinemann, 1995; Pahl et al., 1992; Rosmarin et al., 1989). El papel intrínseco de la actividad de la ciclooxigenasa en la diferenciación monocítica es prácticamente desconocido. Solo se conoce de su participación en la diferenciación de la línea celular pre-monocítica U937 por el aumento de la actividad de Cox-1 y Cox-2 en los niveles de proteína (Hoff et al., 1993), así como un aumento en la secreción basal de la PGE₂ (Sellmayer et al., 1994) en las células U937 diferenciadas. Sin embargo la deficiente expresión de CD11c unido a un estado morfológico menos diferenciado de los macrófagos peritoneales deficientes en Cox-2, indica la existencia de una alteración durante su diferenciación-maduración en ausencia de esta enzima. Durante la maduración de un monocito a macrófago activo durante los distintos días de acción del tioglicolato se produce una inducción de CD11c la cual esta

reducida en ausencia de Cox-2, indicando una menor maduración a macrófago activo. Cultivos de monocitos cultivados en presencia de GM-CSF muestran un incremento significativo en los niveles de expresión de CD11c (Georgakopoulos et al., 2008), y además en condiciones inflamatorias los macrófagos pueden originarse directamente desde monocitos de una manera dependiente de GM-CSF (Yamazaki et al., 2008). Observamos que la ausencia de Cox-2 en macrófagos ya maduros, implica una reducción en la expresión del receptor de GM-CSF (GM-CSF-R), corroborada con tratamientos con inhibidores específicos de la actividad enzimática de Cox-2 en macrófagos control. Por otro lado no observamos diferencias de distintos marcadores de diferenciación como Ly6C, F4/80 y CD16/32, durante la diferenciación de macrófagos a partir de células de la médula ósea, ni tampoco en la expresión del receptor de GM-CSF. En este sentido cabe destacar que durante la diferenciación de macrófagos a partir de células de la médula ósea, la ausencia de Cox-2 implica una reducción de la expresión de CD11c sólo en los últimos días del proceso de diferenciación, que coincide con la aparición de la expresión de Cox-2 en éstas células. Es decir, células con un fenotipo de macrófago maduro. En conjunto, nuestros resultados indican que la ausencia de Cox-2 afecta a la señalización de GMCSF-R-CD11c, clave para mantener el estado maduro de los macrófagos como se observa en el modelo siguiente.



Papel de Cox-2 en fagocitosis y en presentación de antígeno.

La activación de la respuesta inmune adquirida requiere una necesaria interacción coordinada entre macrófagos o células dendríticas con las células T y B. Las células dendríticas son las principales responsables del proceso de presentación antigénica en nódulos linfáticos, mientras que los macrófagos ejercen su actividad presentadora principalmente en el foco de infección, propiciando la proliferación de células T. Existen ciertas evidencias de la implicación de la producción de PGE₂ por el macrófago en éste proceso (Manickasingham & Reis e Sousa, 2001). En los nódulos linfáticos se han descrito poblaciones de macrófagos (Chao & MacPherson, 1989) pero se desconoce el mecanismo por el cual estos macrófagos son capaces de adquirir antígenos para su posterior presentación, aunque se cree que es un proceso mediado por receptores “scavenger” (Taylor et al., 2005). La fagocitosis así como la degradación intracelular de patógenos y la presentación antigénica, son importantes para el control de las infecciones (Taborda & Casadevall, 2002), siendo esta una de las actividades clave de los macrófagos en la respuesta inmune adaptativa. Nuestros resultados muestran que la ausencia de Cox-2 en los macrófagos peritoneales reduce la capacidad de eliminar o digerir *E.coli* fagocitada sin observarse aparentemente alteraciones a la hora de captarla. Los macrófagos son capaces de destruir patógenos a través de la liberación de moléculas citotóxicas como óxido nítrico (NO) o especies reactivas de oxígeno (ROS). La producción de NO a partir de macrófagos activados es un paso crítico para el control de la infección por virus, bacterias y protozoos (Bogdan et al., 2000). El NO es sintetizado en macrófagos por la enzima inducible iNOS tras la activación de los macrófagos por estímulos como LPS e IFN γ (Bogdan et al., 2000; Byeon et al., 2009). Recientes estudios sobre la regulación de la expresión de Cox-2 en macrófagos han constatado la necesaria participación de varios factores de transcripción, entre los que destacan CREB, NF κ B, AP1 y Egr1, para su completa inducción transcripcional en respuesta a LPS (Diaz-Munoz et al., 2010; Kang et al., 2006). Estos mismos factores regulan la transcripción en macrófagos de otros genes pro-inflamatorios como iNOS (Vila-del Sol et al., 2007). Observamos que en macrófagos deficientes en Cox-2 existen menores niveles de I κ B, proteína inhibidora de NF κ B. Tras tratamientos con LPS, I κ B presenta una menor fosforilación y activación, que resultaría en una menor translocación de NF κ B al núcleo. Esto explicaría la menor expresión de iNOS inducida por tratamientos con LPS e IFN γ , y una menor producción de NO que presentan los macrófagos *cox-2*^{-/-}. Todo ello explicaría la deficiente eliminación de la

bacteria fagocitada. En este mismo sentido, cabe mencionar que ciertos trabajos indican que una de las moléculas clave en la actividad bactericida del macrófago es CD11c, la cual está involucrada en la fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis* por macrófagos humanos (Rosas-Taraco et al., 2009a), y junto con CD11b también participa como receptor fagocítico de *Neisseria meningitidis* (Jones et al., 2008).

El papel de Cox-2 en fagocitosis es muy interesante y novedoso. De confirmarse y extender nuestros resultados a otras bacterias/patógenos, la inhibición de Cox-2 por AINEs podría conducir a una cierta incapacidad del sistema inmune a controlar infecciones. Conviene recordar que estos AINEs se administran a los pacientes en cualquier proceso inflamatorio incluido a los infecciosos.

La menor capacidad de eliminar el patógeno fagocitado en ausencia de Cox-2, podría estar asimismo asociado a defectos a la hora de procesar y presentar antígeno a las células T. Es imprescindible el reconocimiento por el receptor del linfocito T (TCR) de un antígeno expuesto por los macrófagos o células presentadoras de antígeno, en el contexto del complejo de histocompatibilidad MHC. La interacción del CD40L de los linfocitos T con el CD40 de las células presentadoras de antígeno potencia la activación de los linfocitos T. También se ve aumentada la activación de las células T por macrófagos mediante la participación de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86. (Goerdts & Orfanos, 1999; Hallman et al., 2001). En un modelo de presentación de un péptido de ovoalbúmina reconocido específicamente por las células T de los ratones OTII, observamos que la ausencia de Cox-2 reduce la activación de los linfocitos T, cuando los macrófagos presentan tanto el péptido de ovoalbúmina específico como la proteína de ovoalbúmina completa. Además los macrófagos *cox-2*^{-/-} presentan una menor inducción de CD40 con LPS, una distribución alterada de MHCII tras la inducción con IFN γ , al igual que una menor expresión en membrana de co-estimuladores CD80 y CD86, que tampoco se inducen con tratamientos con LPS. Por lo tanto podemos concluir que los macrófagos deficientes en Cox-2 también tienen deficiencias en su capacidad de presentar y activar a linfocitos T, debido a que los niveles de moléculas co-estimuladoras y de CD40 son menores.

Los macrófagos *cox-2*^{-/-} tienen bajos niveles de CD11c. Recientes estudios de obesidad con ratones *CD11c*^{-/-} muestran una menor expresión en macrófagos de MHCII que contribuye a una menor acumulación y activación de células T en el tejido adiposo. (Wu et al.2010). También en ratones *CD11*^{-/-} se observa una reducción drástica de la

encefalomielitis con una reducción en la infiltración de linfocitos T en la médula espinal (Bullard et al., 2007). Estos resultados junto con los mostrados en este trabajo asocian deficiencias en Cox-2 y CD11c en macrófagos con deficiente activación de linfocitos T.

Por otro lado también observamos una reducida expresión en membrana de CD68 tanto en condiciones basales como inducida con LPS en macrófagos *cox-2^{-/-}*. CD68 además de participar en las actividades fagocíticas de los macrófagos es un marcador de diferenciación de macrófagos. En modelos de cáncer mamario los macrófagos tumorales presentan una menor maduración, una expresión reducida de los factores de transcripción NFκB y C/EBP, junto con una menor expresión de CD68 y un incremento en la producción de la IL-12p70 (Torroella-Kouri et al., 2009). Analizando la producción de diferentes citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias con tratamientos con LPS en macrófagos activos, la ausencia de Cox-2 e inducida por LPS también da lugar a una mayor producción de la IL-12p70 en comparación con los macrófagos *cox-2^{+/+}*. Todo ello junto con una menor expresión de CD68, apoyan la idea de que Cox-2 presenta un papel importante en la maduración y activación de los macrófagos. Además diferentes estudios muestran que PGE₂ inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-12p70 y promueve la producción de anti-inflamatorias como IL-10 (Betz & Fox, 1991) (Harizi et al., 2001; Kalinski et al., 1997; Katamura et al., 1995), determinando que la producción de IL-12p70 es dependiente de PGE₂ en macrófagos activados. A su vez observamos una menor producción de la quimioquina MCP-1 en concordancia con otros trabajos (Cipollone et al., 2005), y cuya expresión es dependiente de PGE₂ (Nakayama et al., 2006), lo que sugiere una relación con defectos en migración hasta ahora no estudiados.

Implicación de las prostaglandinas dependientes de Cox-2 en la migración de los macrófagos.

Análisis de los exudados peritoneales de ratones *cox-2^{+/+}* y *cox-2^{-/-}* obtenidos durante los diferentes días de acción del tioglicolato, muestran durante los primeros días un mayor porcentaje de neutrófilos Gr1⁺ y un menor porcentaje de macrófagos F4/80⁺ en ratones deficientes en Cox-2. Esto se relaciona con una migración retardada de los macrófagos encargados, entre otras cosas, de fagocitar los restos celulares de los neutrófilos que ya han actuado en el foco inflamatorio (Shibata et al., 2011; Soehnlein et al., 2009). En los

últimos años la idea que se tenía de los macrófagos como meros fagocitos se ha ido ampliando con el conocimiento de nuevas poblaciones de macrófagos con funciones efectoras diferentes (Galli et al., 2011). Como hemos comentado anteriormente los macrófagos migran y actúan como células presentadoras de antígeno para activar la respuesta inmune adaptativa, aunque son considerados menos eficientes que las células dendríticas (Gordon & Taylor, 2005). Nuevas evidencias apoyan y muestran cambios en monocitos-macrófagos implicados en la migración celular tanto dentro como fuera del foco inflamatorio (Potteaux et al., 2011). Sin embargo la emigración de los macrófagos desde el foco inflamatorios hacia regiones diferentes no se conoce completamente (Bellingan et al., 1996; Broche & Tellado, 2001; van Gils et al., 2012). Este tipo de capacidad de los macrófagos de poder emigrar fuera del foco inflamatorio para actuar como células presentadoras nos ha servido para elaborar un modelo *in vivo* que nos permite estudiar el papel de Cox-2 en este proceso. Observamos que tratamientos con LPS inducen a los macrófagos a emigrar del peritoneo al nódulo. Sin embargo, en ausencia de Cox-2 se reduce tal capacidad y los macrófagos activos permanecen en el foco inflamatorio. Todo esto se correlaciona con la defectiva migración *in vitro* de los macrófagos *cox-2^{-/-}* en respuesta a diferentes quimioquinas sin observarse ningún defecto a la hora de expresar los receptores específicos de las mismas. A su vez tampoco observamos deficiencias en cuanto a la expresión en membrana de diferentes integrinas, excepto en la expresión de CD11c mencionada anteriormente. Por otro lado el defecto de emigración de los macrófagos deficientes en Cox-2 también se correlaciona con una reducción en la adhesión celular al mesotelio en respuesta a LPS *in vivo*, como a diferentes moléculas de adhesión, *in vitro*.

Las integrinas son conocidas por activar múltiples cascadas de señalización requeridas para la migración de los macrófagos (Imhof & Aurrand-Lions, 2004; Ley et al., 2007; Worthylake & Burridge, 2001). El “clustering” de integrinas implica la participación de más de 100 proteínas asociadas a través de más de 500 interacciones (Zaidel-Bar et al., 2007). Recientemente se ha encontrado que las integrinas inducen la expresión de Cox-2, la cual está asociada con la activación de FAK en células mesangiales (Alique et al., 2011). Nuestros resultados muestran que los macrófagos deficientes en Cox-2 presentan un defecto en la adhesión celular asociado con un defecto en la reorganización del citoesqueleto de actina junto con la reducción en el número de adhesiones focales observadas a través de la microscopía confocal. No hemos encontrado diferencias o

defectos en cuanto a la polimerización de actina en ausencia de Cox-2, lo que sugiere que el problema se encuentra en la transducción de la señalización celular a partir de la formación de las adhesiones focales. La activación de FAK y de las GTPasas de la familia de las Rho son necesarias para la remodelación del citoesqueleto y de la adhesión celular (Tomar & Schlaepfer, 2009). FAK fosforilado conduce a la señalización de diferentes moléculas como paxilina, cuya forma activa implica la fosforilación de la tirosina 118, la cual es requerida para la migración de células cancerígenas (McLean et al., 2005). La paxilina fosforilada también regula la dinámica de adhesión asociada a la formación de los contactos focales (Zaidel-Bar et al., 2007). En ausencia de Cox-2 la fosforilación de la tirosina 118 de la paxilina se encuentra significativamente reducida en múltiples condiciones de adhesión, así como en presencia de la quimioquina Rantes. La línea celular HCT-116, en la cual Cox-2 es sobre-expresado, muestra un incremento de la fosforilación de FAK, incrementando su actividad quinasa (Choi et al., 2010). Por otro lado, PGE₂ induce FAK y la fosforilación de paxilina con la subsecuente migración de las células cancerígenas (Bai et al., 2009). Estas deficiencias en señalización apoyan la falta de adhesión y posterior migración a múltiples estímulos inflamatorios de los macrófagos en ausencia de Cox-2.

Curiosamente descubrimos en nuestro estudio una relación entre la expresión de Cox-2, y la señalización a partir de la vía de actuación de la familia de las PI3K. PI3K señala por debajo de Paxilina en la ruta de señalización mediada a partir de integrinas (Guan, 2010). Analizando mediante inmunotransferencia la expresión de diferentes moléculas implicadas en la cascada de señalización, observamos que en ausencia de Cox-2 los macrófagos presentan una menor expresión de Akt fosforilado tanto en condiciones basales como en respuesta a la quimioquina Rantes. Los macrófagos y los monocitos expresan predominantemente Akt1 y Akt2 (Shiratsuchi & Basson, 2007). Durante la activación de los macrófagos Akt actúa señalizando por encima de la ruta de señalización activando IKK. Ésta proteína quinasa fosforila a IκB, conduciendo a su degradación y por tanto la liberación del factor NFκB, el cual se transloca al núcleo induciendo en el macrófago la expresión de mediadores inflamatorios como iNOS, TNF-α, IL-1 y Cox2 (Funakoshi-Tago et al., 2009; Jackson-Bernitsas et al., 2007). Akt incluso está implicada en la fagocitosis mediada por los receptores Fcγ (Ganesan et al., 2004) y se comporta como un regulador actuando por encima de la ruta de la señalización intracelular durante procesos quimiotácticos a partir de la activación de las proteínas G acopladas a los

receptores de quimioquinas (Furundzija et al., 2010 ; Mosheimer et al., 2005; Papakonstanti et al., 2007; Papakonstanti et al., 2008; Zhang et al., 2009). También Akt regula la activación de mTOR, el cual es un mediador central del crecimiento celular y de la diferenciación y función de las células inmunes (Hay & Sonenberg, 2004). Es decir, observamos que Akt está implicado en numerosas rutas y funciones de macrófagos, las cuales se ven asimismo comprometidas con la ausencia de Cox-2. A su vez la total activación de Akt depende de la actividad de las PI3K. El papel de las PI3K en la adhesión y migración celular ha sido extensamente estudiado. La activación de las PI3K es requerido para la migración y extensión de los macrófagos (Meng & Lowell, 1998). PI3K es activada a través de los receptores de quimioquinas (Wong & Fish, 2003), y a través de PGE₂ (Alfranca et al., 2006). La familia de las PI3K está clasificada por tres grupos. La clase I de las PI3K p110 γ y p110 δ juegan un importante papel en la regulación de la migración de los leucocitos (Liu et al., 2007a). Un dato muy sorprendente obtenido, es que los macrófagos *cox-2*^{-/-} expresan niveles muy reducidos de la subunidad p110 γ comparados con los *cox-2*^{+/+} analizados en diferentes condiciones de adhesión a ICAM-1 y en presencia de la quimioquina Rantes. Además la inhibición de Cox-2 con Celecoxib en macrófagos normales reduce sensiblemente los niveles de p110 γ .

Por otro lado se ha descrito que los macrófagos p110 γ ^{-/-} muestran una migración reducida hacia un amplio rango de estímulos quimiotácticos junto con su acumulación defectiva en los modelos de peritonitis inducida (Chang et al., 2007; Hirsch et al., 2000). Estos resultados demuestran que p110 γ PI3K es una molécula de señalización fundamental requerida para la migración y acumulación de los macrófagos en los focos de inflamación al igual que Cox-2 y que probablemente los efectos de Cox-2 en migración sean debidos a la ausencia de p110 γ .

La reducida expresión de p110 γ y la reducida fosforilación de Akt conducen a un defecto en la activación de Rac y Cdc42 en macrófagos deficientes en Cox-2. PI3K regula la activación de Rac y Cdc42 (Beemiller et al., 2010; Larson et al., 2010; Welch et al., 2003). La familia de las Rho GTPasas transduce señales generadas a partir de receptores de quimioquinas y moléculas de adhesión que sirven como puntos de unión entre diferentes vías de señalización implicadas en la migración (Tybulewicz & Henderson, 2009). Observamos que los macrófagos peritoneales tratados tanto con inhibidores totales de las PI3Ks como específicos de p110 γ PI3K, provocan una reducción significativa de la migración en respuesta a Rantes y de la adhesión a ICAM-1. Por otro lado observamos

que tratamientos con PGE₂ a bajas concentraciones incrementan la expresión de p110 γ , al igual que la migración en respuesta a quimioquina. En cambio cuando inhibimos la producción de PGE₂ con un inhibidor específico de Cox-2, Celecoxib, se ve reducida su expresión aunque posteriormente es recuperada con PGE₂ así como la migración. Por lo tanto nuestros resultados señalan que la expresión de Cox-2 en macrófagos es necesaria para mantener la unión PI3K-GTPasas para la adhesión y la migración celular. A su vez nuestros datos también refuerzan la idea de que la expresión diferencial de las distintas isoformas de las PI3K, tanto a nivel celular como de cinética de expresión, es importantes en procesos altamente regulados (Liu et al., 2007a; Vadas et al., 2011).

Efectos de PGE₂ en la migración y adhesión de los macrófagos.

PGE₂ ha demostrado ser capaz de potenciar la migración de varios tipos celulares (Rao et al., 2007; Tajima et al., 2008; van Helden et al., 2006; Yen et al., 2008). Aunque algunos estudios han mostrado la habilidad de diferentes prostaglandinas en modular la adhesión celular, los mecanismos moleculares implicados todavía no están muy claros. Previos estudios en células tumorales sugieren la implicación de las PGs derivadas de Cox-2 en la activación de FAK y en la migración celular. Así PGE₂ induce FAK y la fosforilación de paxilina con la subsecuente migración de células cancerígenas (Bai et al., 2009). Con el objetivo de clarificar cual de las diferentes prostaglandinas dependientes de Cox-2 estaba implicada en las deficiencias observadas en macrófagos *cox-2*^{-/-}, tratamos de revertir los efectos de esas deficiencias con las prostaglandinas más abundantes producidas por Cox-2 en macrófagos, PGE₂ y PGF_{2 α} . El análisis de los resultados obtenidos muestra que el fenómeno es complejo. Así observamos que PGE₂ presenta diferentes funciones dependiente de la concentración. Por ejemplo hemos observado que la expresión de p110 γ se incrementa con bajas concentraciones de PGE₂ sin verse afectada su expresión con concentraciones elevadas. Es importante señalar que la investigación con varios tipos de células han demostrado efectos diferenciales de PGE₂ cuando es usado en el rango de nanomolar o de micromolar (Billotte & Vesin, 1997; Kather, 1982; Loffler et al., 2008) (Sreeramkumar et al., 2011). Por ejemplo concentraciones nanomolares de PGE₂ potencian la diferenciación de Th1 y Th17 a través de la señalización de PI3K y PKA respectivamente, mediado por los receptores EP2 y EP4 (Yao et al., 2009). También la producción de MCP-1 por parte de los mastocitos primarios difiere según la dosis de PGE₂ (Nakayama et al., 2006). Por tanto, es

fundamental entender que PGE₂ tiene distintas capacidades, muchas veces opuestas, para modificar las funciones de diferentes tipos celulares en función de si el proceso se produce durante condiciones fisiológicas normales o situaciones de alta inflamación.

PGE₂ es capaz de regular la expresión de receptores de quimioquinas como CCR2, CCR5 o CCR7 (Chen et al., 2004; Liang et al., 2003; Zeidler et al., 2000). PGE₂, añadida exógenamente, en condiciones de inflamación produce la reducción de la migración de las células dendríticas en respuesta a CCL19 (Liu et al., 2011). Por otro lado existen evidencias que PGE₂ induce la expresión funcional de CCR7 en monocitos humanos permitiendo su migración en respuesta a las quimioquinas CCL19 y CCL21 (Cote et al., 2009). Como muestran nuestros resultados, elevadas concentraciones de PGE₂ disminuyen la migración de los macrófagos peritoneales en respuesta a diferentes quimioquinas. Esta reducción de la migración a dosis elevadas de PGE₂ puede explicarse debido a que a su vez produce una reducción en la expresión de FAK y su forma fosforilada, junto con una menor adhesión de los macrófagos en presencia de la quimioquina Rantes, y sin producirse modificaciones en cuanto a la expresión de los diferentes receptores EPs que pudieran potenciar su efecto. En ensayos de migración *in vivo* en respuesta a LPS también observamos que las células CD11b⁺ en respuesta a dosis elevadas a PGE₂ reducen su migración al peritoneo. Cabe destacar que no observamos tal efecto empleando dosis elevadas de PGF_{2α}, tanto en la migración en respuesta a diferentes quimioquinas como en ensayos *in vivo*. La síntesis de PGE₂ se ha demostrado necesaria para la expresión de la integrina αVβ3 implicada en la adhesión, migración y angiogénesis (Chan et al., 2007). PGE₂ en concentraciones inflamatorias micromolares, produce la reducción de la expresión de las integrinas ICAM-1, CD11a y CD11c (algo menos CD29 y apenas sin verse afectada la expresión de CD18) en los macrófagos peritoneales. En cambio tratamientos exógenos con PGF_{2α} no producen ninguna alteración en su expresión. En resumen PGE₂ en condiciones inflamatorias y en presencia de quimioquina disminuye la formación de contactos focales debido a una menor expresión de FAK y una menor expresión de integrinas de membrana, reduciendo a su vez la adhesión de los macrófagos y su subsecuente migración.

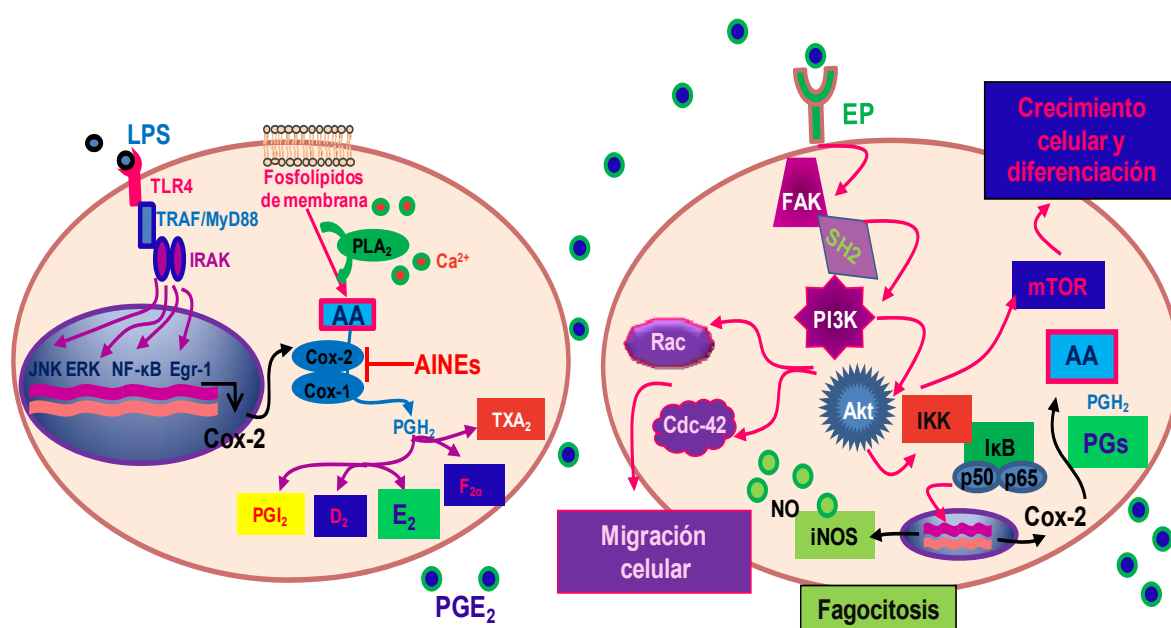
Por otro lado cuando analizamos la adhesión de los macrófagos peritoneales, en ausencia de quimioquinas, observamos que a elevadas concentraciones de PGE₂ se produce un incremento en la adhesión a fibronectina unido a una mayor expresión de FAK y su forma fosforilada. La señal de Ca²⁺ inducida por PGE₂, produce un incremento

en los mastocitos procedentes de médula ósea en la reorganización del citoesqueleto de actina mediante la activación de Rac (Kuehn et al., 2010). Observamos que PGE₂ en concentraciones elevadas también mejora la reorganización del citoesqueleto de actina en los macrófagos. Por tanto en resumen PGE₂ en condiciones de adhesión y en un entorno inflamatorio incrementa la adhesión de los macrófagos a nivel de la formación de contactos focales y de la reorganización del citoesqueleto. Todo esto nos puede hacer pensar que pueda existir una elección por parte de la célula a interponer una señal pro-inflamatoria como es PGE₂, ante una señal migratoria inducida por quimioquinas, facilitando a la célula a retenerse o mantenerse en el foco inflamatorio.

Uno de los principales objetivos que nos planteamos en este trabajo era saber si tratamientos con diferentes PGs pudieran revertir el fenotipo estudiado de los macrófagos *cox-2*^{-/-} con objeto de asignar la deficiencia a una PGs en particular. Después de haber observado el efecto cambiante de PGE₂ tanto en condiciones de migración como de adhesión, unido a su papel en función de su concentración, es difícil interpretar los resultados inequívocamente. Conseguimos revertir la reducida capacidad de adhesión de los macrófagos deficientes en Cox-2, con PGE₂, sin verse afectada la expresión en membrana de los receptores EPs, y viéndose notablemente mejorada la reorganización de su citoesqueleto. Este resultado corrobora que PGE₂, en este caso añadida exógenamente, en concentraciones pro-inflamatorias, mantiene, o activa la señalización mediada por la vía Paxillin/ p110γ PI3K/Akt/Cdc42/Rac1 mediando la adhesión celular, como en el caso de producción autocrina en los macrófagos *cox-2*^{-/-}. Teniendo en cuenta éste ciclo de retroalimentación y el hecho de que Cox-2 sólo se expresa en macrófagos maduros, explicaría que los efectos de la deficiencia de Cox-2 sólo se observan en macrófagos maduros activados. Así mismo, estos efectos parecen reproducirse con incubaciones cortas con AINEs como Celecoxib. Esto sugiere que algunos de los efectos anti-inflamatorios de estas drogas podrían deberse a los mecanismos descritos en esta memoria. Por último cabe destacar que la ausencia de Cox-2 parece regular los niveles de CD11c en macrófagos (pero no en células dendríticas). Futuros experimentos determinarán la relación entre ambos fenómenos. Nuestros resultados aportan pues nuevos datos para explicar el mecanismo de acción de Cox-2 y por extrapolación de las AINEs en inflamación.

Por lo tanto podemos pensar que la actividad enzimática de Cox-2, y más específicamente PGE₂ en macrófagos, es fundamental para activar o mantener ciertas

rutas de señalización relacionadas con la activación de estas células y su migración (ver modelo). Nuestros resultados sugieren que la producción autocrina de PGs, en concreto PGE_2 secretada a partir de los macrófagos activados por estímulos pro-inflamatorios, es necesaria para el mantenimiento de su estado activo, en el cual se incluye su capacidad migratoria y presentadora, a través del mantenimiento de los niveles de $\text{p110}\gamma$ y de su señalización mediada por la vía Paxillin/ $\text{p110}\gamma$ PI3K/Akt/Cdc42/Rac1. Previos resultados de nuestro laboratorio que sugieren que la secreción autocrina de PGE_2 es necesaria para mantener éstas células completamente activadas, especialmente para mantener niveles elevados de Cox-2 y de mPGES-1 en un ciclo de retroalimentación (Díaz-Munoz et al., 2010).



Conclusión

1. La deficiencia en Cox-2 resulta en una disminución selectiva en la migración de los macrófagos hacia el peritoneo inflamado.
2. Los macrófagos deficientes en Cox-2 presentan una menor expresión de CD11c unida a una menor expresión del receptor de GM-CSF asociada a una deficiente capacidad para mantener el estado maduro del macrófagos.
3. Los macrófagos deficientes en Cox-2 presentan una mayor dificultad de eliminar *E.coli* fagocitada asociada a una menor expresión de la enzima iNOS y menor producción de NO.
4. La ausencia de Cox-2 implica una deficiente activación de los macrófagos representada por una menor activación de NF- κ B, una menor expresión de CD40, de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 y una distribución alterada de MHCII.
5. Los macrófagos deficientes en Cox-2 presentan una capacidad disminuida de activar y presentar antígeno a los linfocitos T.
6. Los macrófagos deficientes en Cox-2 presentan un defecto en la emigración retroperitoneal hacia los ganglios linfáticos así como también en la adhesión a la membrana peritoneal *in vivo*. También presentan un defecto en la adhesión a proteínas de la matriz extracelular e inmunoglobulinas y migración defectuosa a quimioquinas *in vitro*.
7. Desde el punto de vista molecular, la reestructuración del citoesqueleto de actina y la formación de uniones focales están alteradas en macrófagos deficientes en Cox-2 debido a un defecto en la señalización mediada por integrinas asociada con la actividad de la vía Paxillin/p110 γ /Akt/Cdc42/Rac1.
8. El efecto de PGE₂ modula la migración y adhesión de los macrófagos, dependiente de su concentración.
9. Concentraciones inflamatorias de PGE₂, logran revertir la reducida adhesión de los macrófagos deficientes en Cox-2, mejorando la reestructuración del citoesqueleto de actina, asociada con la actividad de la vía Paxillin/p110 γ /Akt/Cdc42/Rac1.
10. La PGF_{2a} no afecta a los procesos de activación, migración y adhesión de los macrófago.

Bibliografia

- Abdel-Tawab M., Zettl H. and Schubert-Zsilavecz M. (2009) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a critical review on current concepts applied to reduce gastrointestinal toxicity. *Curr Med Chem* **16**, 2042-63.
- Abram C. L. and Lowell C. A. (2009) The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol* **27**, 339-62.
- Abramovitz M., Boie Y., Nguyen T., Rushmore T. H., Bayne M. A., Metters K. M., Slipetz D. M. and Grygorczyk R. (1994) Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor. *J Biol Chem* **269**, 2632-6.
- Alessi D. R., Andjelkovic M., Caudwell B., Cron P., Morrice N., Cohen P. and Hemmings B. A. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J* **15**, 6541-51.
- Alessi D. R., James S. R., Downes C. P., Holmes A. B., Gaffney P. R., Reese C. B. and Cohen P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* **7**, 261-9.
- Alfranca A., Iniguez M. A., Fresno M. and Redondo J. M. (2006) Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* **70**, 446-56.
- Alique M., Calleros L., Luengo A., Grieria M., Iniguez M. A., Punzon C., Fresno M., Rodriguez-Puyol M. and Rodriguez-Puyol D. Changes in extracellular matrix composition regulate cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **300**, C907-18.
- Altieri D. C., Agbanyo F. R., Plescia J., Ginsberg M. H., Edgington T. S. and Plow E. F. (1990) A unique recognition site mediates the interaction of fibrinogen with the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Biol Chem* **265**, 12119-22.
- An H., Yu Y., Zhang M., Xu H., Qi R., Yan X., Liu S., Wang W., Guo Z., Guo J., Qin Z. and Cao X. (2002) Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology* **106**, 38-45.
- Andreasson K. Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **91**, 104-12.
- Arnould T., Thibaut-Vercruyssen R., Bouaziz N., Dieu M., Remacle J. and Michiels C. (2001) PGF(2alpha), a prostanoid released by endothelial cells activated by hypoxia, is a chemoattractant candidate for neutrophil recruitment. *Am J Pathol* **159**, 345-57.
- Baggiolini M. (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**, 565-8.
- Bai X. M., Zhang W., Liu N. B., Jiang H., Lou K. X., Peng T., Ma J., Zhang L., Zhang H. and Leng J. (2009) Focal adhesion kinase: important to prostaglandin

E2-mediated adhesion, migration and invasion in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep* **21**, 129-36.

- Barreiro O., de la Fuente H., Mittelbrunn M. and Sanchez-Madrid F. (2007) Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol Rev* **218**, 147-64.
- Basu S. (2007) Novel cyclooxygenase-catalyzed bioactive prostaglandin F2alpha from physiology to new principles in inflammation. *Med Res Rev* **27**, 435-68.
- Basu S., Whiteman M., Matthey D. L. and Halliwell B. (2001) Raised levels of F(2)-isoprostanes and prostaglandin F(2alpha) in different rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* **60**, 627-31.
- Bauermeister K., Burger M., Almanasreh N., Knopf H. P., Schumann R. R., Schollmeyer P. and Dobos G. J. (1998) Distinct regulation of IL-8 and MCP-1 by LPS and interferon-gamma-treated human peritoneal macrophages. *Nephrol Dial Transplant* **13**, 1412-9.
- Beemiller P., Zhang Y., Mohan S., Levinsohn E., Gaeta I., Hoppe A. D. and Swanson J. A. A Cdc42 activation cycle coordinated by PI 3-kinase during Fc receptor-mediated phagocytosis. *Mol Biol Cell* **21**, 470-80.
- Bellingan G. J., Caldwell H., Howie S. E., Dransfield I. and Haslett C. (1996) In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes. *J Immunol* **157**, 2577-85.
- Bellingan G. J., Xu P., Cooksley H., Cauldwell H., Shock A., Bottoms S., Haslett C., Mutsaers S. E. and Laurent G. J. (2002) Adhesion molecule-dependent mechanisms regulate the rate of macrophage clearance during the resolution of peritoneal inflammation. *J Exp Med* **196**, 1515-21.
- Ben Nasr A., Haithcoat J., Masterson J. E., Gunn J. S., Eaves-Pyles T. and Klimpel G. R. (2006) Critical role for serum opsonins and complement receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in phagocytosis of *Francisella tularensis* by human dendritic cells (DC): uptake of *Francisella* leads to activation of immature DC and intracellular survival of the bacteria. *J Leukoc Biol* **80**, 774-86.
- Benard V., Bohl B. P. and Bokoch G. M. (1999) Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J Biol Chem* **274**, 13198-204.
- Betz M. and Fox B. S. (1991) Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol* **146**, 108-13.
- Bilson H. A., Mitchell D. L. and Ashby B. (2004) Human prostaglandin EP3 receptor isoforms show different agonist-induced internalization patterns. *FEBS Lett* **572**, 271-5.

- Billotte C. and Vesin M. F. (1997) Comparative study of prostaglandin E2 production in chick spinal cord and meninges. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **56**, 169-75.
- Blankenberg S., Barbaux S. and Tiret L. (2003) Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **170**, 191-203.
- Bogdan C., Rollinghoff M. and Diefenbach A. (2000) Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* **12**, 64-76.
- Bowman C. C. and Bost K. L. (2004) Cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin E2 production in mesenteric lymph nodes and in cultured macrophages and dendritic cells after infection with Salmonella. *J Immunol* **172**, 2469-75.
- Brandt K., Bulfone-Paus S., Foster D. C. and Ruckert R. (2003) Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood* **102**, 4090-8.
- Brinckerhoff C. E. and Matrisian L. M. (2002) Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 207-14.
- Broche F. and Tellado J. M. (2001) Defense mechanisms of the peritoneal cavity. *Curr Opin Crit Care* **7**, 105-16.
- Bullard D. C., Hu X., Adams J. E., Schoeb T. R. and Barnum S. R. (2007) p150/95 (CD11c/CD18) expression is required for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* **170**, 2001-8.
- Burleigh M. E., Babaev V. R., Oates J. A., Harris R. C., Gautam S., Riendeau D., Marnett L. J., Morrow J. D., Fazio S. and Linton M. F. (2002) Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* **105**, 1816-23.
- Burridge K. and Wennerberg K. (2004) Rho and Rac take center stage. *Cell* **116**, 167-79.
- Byeon S. E., Lee J., Lee E., Lee S. Y., Hong E. K., Kim Y. E. and Cho J. Y. (2009) Functional activation of macrophages, monocytes and splenic lymphocytes by polysaccharide fraction from *Tricholoma matsutake*. *Arch Pharm Res* **32**, 1565-72.
- Cabanas C. and Sanchez-Madrid F. (1999) CD11b (leukocyte integrin CR3 alpha subunit). *J Biol Regul Homeost Agents* **13**, 130-3.
- Cao C., Lawrence D. A., Strickland D. K. and Zhang L. (2005) A specific role of integrin Mac-1 in accelerated macrophage efflux to the lymphatics. *Blood* **106**, 3234-41.
- Carey M. A., Bradbury J. A., Seubert J. M., Langenbach R., Zeldin D. C. and Germolec D. R. (2005) Contrasting effects of cyclooxygenase-1 (COX-1) and

COX-2 deficiency on the host response to influenza A viral infection. *J Immunol* **175**, 6878-84.

- Cipollone F., Fazia M. L., Iezzi A., Cuccurullo C., De Cesare D., Uchino S., Spigonardo F., Marchetti A., Buttitta F., Paloscia L., Mascellanti M., Cuccurullo F. and Mezzetti A. (2005) Association between prostaglandin E receptor subtype EP4 overexpression and unstable phenotype in atherosclerotic plaques in human. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 1925-31.
- Constantin G., Majeed M., Giagulli C., Piccio L., Kim J. Y., Butcher E. C. and Laudanna C. (2000) Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* **13**, 759-69.
- Corbi A. L. and Lopez-Rodriguez C. (1997) CD11c integrin gene promoter activity during myeloid differentiation. *Leuk Lymphoma* **25**, 415-25.
- Coso O. A., Chiariello M., Yu J. C., Teramoto H., Crespo P., Xu N., Miki T. and Gutkind J. S. (1995) The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**, 1137-46.
- Cote S. C., Pasvanis S., Bounou S. and Dumais N. (2009) CCR7-specific migration to CCL19 and CCL21 is induced by PGE(2) stimulation in human monocytes: Involvement of EP(2)/EP(4) receptors activation. *Mol Immunol* **46**, 2682-93.
- Crabbe T. (2007) Exploring the potential of PI3K inhibitors for inflammation and cancer. *Biochem Soc Trans* **35**, 253-6.
- Curnock A. P., Logan M. K. and Ward S. G. (2002) Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases. *Immunology* **105**, 125-36.
- Chakraborti A. K., Garg S. K., Kumar R., Motiwala H. F. and Jadhavar P. S. Progress in COX-2 inhibitors: a journey so far. *Curr Med Chem* **17**, 1563-93.
- Chan K. T., Cortesio C. L. and Huttenlocher A. (2007) Integrins in cell migration. *Methods Enzymol* **426**, 47-67.
- Chang J. D., Sukhova G. K., Libby P., Schwartz E., Lichtenstein A. H., Field S. J., Kennedy C., Madhavarapu S., Luo J., Wu D. and Cantley L. C. (2007) Deletion of the phosphoinositide 3-kinase p110gamma gene attenuates murine atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8077-82.
- Chao D. and MacPherson G. G. (1989) Lymph node macrophage heterogeneity: the phenotypic and functional characterization of two distinct populations of macrophages from rat lymph node. *Eur J Immunol* **19**, 1273-81.
- Chen H. C., Appeddu P. A., Isoda H. and Guan J. L. (1996) Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **271**, 26329-34.

- Chen Q., Muramoto K., Masaaki N., Ding Y., Yang H., Mackey M., Li W., Inoue Y., Ackermann K., Shirota H., Matsumoto I., Spyvee M., Schiller S., Sumida T., Gusovsky F. and Lamphier M. A novel antagonist of the prostaglandin E(2) EP(4) receptor inhibits Th1 differentiation and Th17 expansion and is orally active in arthritis models. *Br J Pharmacol* **160**, 292-310.
- Chen T., Guo J., Yang M., Han C., Zhang M., Chen W., Liu Q., Wang J. and Cao X. (2004) Cyclosporin A impairs dendritic cell migration by regulating chemokine receptor expression and inhibiting cyclooxygenase-2 expression. *Blood* **103**, 413-21.
- Chen Y. F., Jobanputra P., Barton P., Bryan S., Fry-Smith A., Harris G. and Taylor R. S. (2008) Cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs (etodolac, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib and lumiracoxib) for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* **12**, 1-278, iii.
- Choi C. K., Sukhthankar M., Kim C. H., Lee S. H., English A., Kihm K. D. and Baek S. J. Cell adhesion property affected by cyclooxygenase and lipoxygenase: Opto-electric approach. *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 1385-9.
- Choi S. H., Aid S., Choi U. and Bosetti F. Cyclooxygenases-1 and -2 differentially modulate leukocyte recruitment into the inflamed brain. *Pharmacogenomics J* **10**, 448-57.
- Dahl R., Walsh J. C., Lancki D., Laslo P., Iyer S. R., Singh H. and Simon M. C. (2003) Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol* **4**, 1029-36.
- Daniels R. H. and Bokoch G. M. (1999) p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling? *Trends Biochem Sci* **24**, 350-5.
- Dedhar S. and Hannigan G. E. (1996) Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 657-69.
- Diamond M. S., Garcia-Aguilar J., Bickford J. K., Corbi A. L. and Springer T. A. (1993) The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol* **120**, 1031-43.
- Diaz-Munoz M. D., Osma-Garcia I. C., Cacheiro-Llaguno C., Fresno M. and Iniguez M. A. Coordinated up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 transcription by nuclear factor kappa B and early growth response-1 in macrophages. *Cell Signal* **22**, 1427-36.
- Dinchuk J. E., Car B. D., Focht R. J., Johnston J. J., Jaffee B. D., Covington M. B., Contel N. R., Eng V. M., Collins R. J., Czerniak P. M. and et al. (1995) Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* **378**, 406-9.

- Dormond O. and Ruegg C. (2003) Regulation of endothelial cell integrin function and angiogenesis by COX-2, cAMP and Protein Kinase A. *Thromb Haemost* **90**, 577-85.
- Downward J. (1998) Lipid-regulated kinases: some common themes at last. *Science* **279**, 673-4.
- Doyle S. L. and O'Neill L. A. (2006) Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol* **72**, 1102-13.
- Esaki Y., Li Y., Sakata D., Yao C., Segi-Nishida E., Matsuoka T., Fukuda K. and Narumiya S. Dual roles of PGE2-EP4 signaling in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12233-8.
- Evans R., Patzak I., Svensson L., De Filippo K., Jones K., McDowall A. and Hogg N. (2009) Integrins in immunity. *J Cell Sci* **122**, 215-25.
- Fayard E., Tintignac L. A., Baudry A. and Hemmings B. A. (2005) Protein kinase B/Akt at a glance. *J Cell Sci* **118**, 5675-8.
- Fogg D. K., Sibon C., Miled C., Jung S., Aucouturier P., Littman D. R., Cumano A. and Geissmann F. (2006) A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* **311**, 83-7.
- Forster R., Davalos-Misslitz A. C. and Rot A. (2008) CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* **8**, 362-71.
- Fortier M. A., Krishnaswamy K., Danyod G., Boucher-Kovalik S. and Chapdalaine P. (2008) A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. *J Physiol Pharmacol* **59 Suppl 1**, 65-89.
- Franke T. F., Kaplan D. R. and Cantley L. C. (1997) PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* **88**, 435-7.
- Funakoshi-Tago M., Kamada N., Shimizu T., Hashiguchi Y., Tago K., Sonoda Y. and Kasahara T. (2009) TRAF6 negatively regulates TNFalpha-induced NF-kappaB activation. *Cytokine* **45**, 72-9.
- Funk C. D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**, 1871-5.
- Furundzija V., Fritzsche J., Kaufmann J., Meyborg H., Fleck E., Kappert K. and Stawowy P. IGF-1 increases macrophage motility via PKC/p38-dependent alphavbeta3-integrin inside-out signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **394**, 786-91.
- Gahmberg C. G., Tolvanen M. and Kotovuori P. (1997) Leukocyte adhesion--structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands. *Eur J Biochem* **245**, 215-32.

- Galli S. J., Borregaard N. and Wynn T. A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol* **12**, 1035-44.
- Ganesan L. P., Wei G., Pengal R. A., Moldovan L., Moldovan N., Ostrowski M. C. and Tridandapani S. (2004) The serine/threonine kinase Akt Promotes Fc gamma receptor-mediated phagocytosis in murine macrophages through the activation of p70S6 kinase. *J Biol Chem* **279**, 54416-25.
- Geissmann F., Jung S. and Littman D. R. (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71-82.
- Georgakopoulos T., Moss S. T. and Kanagasundaram V. (2008) Integrin CD11c contributes to monocyte adhesion with CD11b in a differential manner and requires Src family kinase activity. *Mol Immunol* **45**, 3671-81.
- Ghandour H., Cullere X., Alvarez A., Luscinskas F. W. and Mayadas T. N. (2007) Essential role for Rap1 GTPase and its guanine exchange factor CalDAG-GEFI in LFA-1 but not VLA-4 integrin mediated human T-cell adhesion. *Blood* **110**, 3682-90.
- Ghosn E. E., Cassado A. A., Govoni G. R., Fukuhara T., Yang Y., Monack D. M., Bortoluci K. R., Almeida S. R., Herzenberg L. A. and Herzenberg L. A. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2568-73.
- Gilroy D. W. and Colville-Nash P. R. (2000) New insights into the role of COX 2 in inflammation. *J Mol Med (Berl)* **78**, 121-9.
- Goerdts S. and Orfanos C. E. (1999) Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* **10**, 137-42.
- Goodwin J. S. (1991) Are prostaglandins proinflammatory, antiinflammatory, both or neither? *J Rheumatol Suppl* **28**, 26-9.
- Gordon S. (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**, 23-35.
- Gordon S. and Taylor P. R. (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **5**, 953-64.
- Gosset P., Pichavant M., Faveeuw C., Bureau F., Tonnel A. B. and Trottein F. (2005) Prostaglandin D2 affects the differentiation and functions of human dendritic cells: impact on the T cell response. *Eur J Immunol* **35**, 1491-500.
- Graupera M., Guillermet-Guibert J., Foukas L. C., Phng L. K., Cain R. J., Salpekar A., Pearce W., Meek S., Millan J., Cutillas P. R., Smith A. J., Ridley A. J., Ruhrberg C., Gerhardt H. and Vanhaesebroeck B. (2008) Angiogenesis selectively requires the p110alpha isoform of PI3K to control endothelial cell migration. *Nature* **453**, 662-6.

- Guan J. L. Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer. *IUBMB Life* **62**, 268-76.
- Hallman M., Ramet M. and Ezekowitz R. A. (2001) Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr Res* **50**, 315-21.
- Han J., Lim C. J., Watanabe N., Soriani A., Ratnikov B., Calderwood D. A., Puzon-McLaughlin W., Lafuente E. M., Boussiotis V. A., Shattil S. J. and Ginsberg M. H. (2006) Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin α IIb β 3. *Curr Biol* **16**, 1796-806.
- Harizi H. and Gualde N. (2006) Pivotal role of PGE2 and IL-10 in the cross-regulation of dendritic cell-derived inflammatory mediators. *Cell Mol Immunol* **3**, 271-7.
- Harizi H., Juzan M., Grosset C., Rashedi M. and Gualde N. (2001) Dendritic cells issued in vitro from bone marrow produce PGE(2) that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol* **209**, 19-28.
- Harris S. G., Padilla J., Koumas L., Ray D. and Phipps R. P. (2002) Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* **23**, 144-50.
- Hawkins P. T., Anderson K. E., Davidson K. and Stephens L. R. (2006) Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* **34**, 647-62.
- Hawkins P. T., Eguinoa A., Qiu R. G., Stokoe D., Cooke F. T., Walters R., Wennstrom S., Claesson-Welsh L., Evans T., Symons M. and et al. (1995) PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr Biol* **5**, 393-403.
- Hay N. and Sonenberg N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* **18**, 1926-45.
- Herlong J. L. and Scott T. R. (2006) Positioning prostanoids of the D and J series in the immunopathogenic scheme. *Immunol Lett* **102**, 121-31.
- Hirsch E., Katanaev V. L., Garlanda C., Azzolino O., Pirola L., Silengo L., Sozzani S., Mantovani A., Altruda F. and Wymann M. P. (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* **287**, 1049-53.
- Hjelle J. T., Miller-Hjelle M. A. and Dobbie J. W. (1995) The biology of the mesothelium during peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* **15**, S13-22; discussion S22-3.
- Hoff T., DeWitt D., Kaever V., Resch K. and Goppelt-Struebe M. (1993) Differentiation-associated expression of prostaglandin G/H synthase in monocytic cells. *FEBS Lett* **320**, 38-42.

- Hoggatt J., Singh P., Sampath J. and Pelus L. M. (2009) Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. *Blood* **113**, 5444-55.
- Hoozemans J. J. and O'Banion M. K. (2005) The role of COX-1 and COX-2 in Alzheimer's disease pathology and the therapeutic potentials of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **4**, 307-15.
- Ikeda H., Nakayama H., Oda T., Kuwano K., Muraishi A., Sugi K., Koga Y. and Toshima H. (1994) Soluble form of P-selectin in patients with acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis* **5**, 515-8.
- Imhof B. A. and Aurrand-Lions M. (2004) Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* **4**, 432-44.
- Iniguez M. A., Cacheiro-Llaguno C., Cuesta N., Diaz-Munoz M. D. and Fresno M. (2008) Prostanoid function and cardiovascular disease. *Arch Physiol Biochem* **114**, 201-9.
- Iniguez M. A., Rodriguez A., Volpert O. V., Fresno M. and Redondo J. M. (2003) Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med* **9**, 73-8.
- Ishii M., Wen H., Corsa C. A., Liu T., Coelho A. L., Allen R. M., Carson W. F. t., Cavassani K. A., Li X., Lukacs N. W., Hogaboam C. M., Dou Y. and Kunkel S. L. (2009) Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype. *Blood* **114**, 3244-54.
- Jackson-Bernitsas D. G., Ichikawa H., Takada Y., Myers J. N., Lin X. L., Darnay B. G., Chaturvedi M. M. and Aggarwal B. B. (2007) Evidence that TNF-TNFR1-TRADD-TRAF2-RIP-TAK1-IKK pathway mediates constitutive NF-kappaB activation and proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* **26**, 1385-97.
- Jakobsson P. J., Thoren S., Morgenstern R. and Samuelsson B. (1999) Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7220-5.
- Jarmin S. J., David R., Ma L., Chai J. G., Dewchand H., Takesono A., Ridley A. J., Okkenhaug K. and Marelli-Berg F. M. (2008) T cell receptor-induced phosphoinositide-3-kinase p110delta activity is required for T cell localization to antigenic tissue in mice. *J Clin Invest* **118**, 1154-64.
- Jones H. E., Strid J., Osman M., Uronen-Hansson H., Dixon G., Klein N., Wong S. Y. and Callard R. E. (2008) The role of beta2 integrins and lipopolysaccharide-binding protein in the phagocytosis of dead *Neisseria meningitidis*. *Cell Microbiol* **10**, 1634-45.
- Kalinski P., Hilkens C. M., Snijders A., Snijdwint F. G. and Kapsenberg M. L. (1997) Dendritic cells, obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE2, promote Th2 responses. *Adv Exp Med Biol* **417**, 363-7.

- Kamei D., Yamakawa K., Takegoshi Y., Mikami-Nakanishi M., Nakatani Y., Oh-Ishi S., Yasui H., Azuma Y., Hirasawa N., Ohuchi K., Kawaguchi H., Ishikawa Y., Ishii T., Uematsu S., Akira S., Murakami M. and Kudo I. (2004) Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin synthase-1. *J Biol Chem* **279**, 33684-95.
- Kamon H., Kawabe T., Kitamura H., Lee J., Kamimura D., Kaisho T., Akira S., Iwamatsu A., Koga H., Murakami M. and Hirano T. (2006) TRIF-GEFH1-RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation. *Embo J* **25**, 4108-19.
- Kang Y. J., Wingerd B. A., Arakawa T. and Smith W. L. (2006) Cyclooxygenase-2 gene transcription in a macrophage model of inflammation. *J Immunol* **177**, 8111-22.
- Katagiri K., Imamura M. and Kinashi T. (2006) Spatiotemporal regulation of the kinase Mst1 by binding protein RAPL is critical for lymphocyte polarity and adhesion. *Nat Immunol* **7**, 919-28.
- Katagiri K., Maeda A., Shimonaka M. and Kinashi T. (2003) RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat Immunol* **4**, 741-8.
- Katamura K., Shintaku N., Yamauchi Y., Fukui T., Ohshima Y., Mayumi M. and Furusho K. (1995) Prostaglandin E2 at priming of naive CD4+ T cells inhibits acquisition of ability to produce IFN-gamma and IL-2, but not IL-4 and IL-5. *J Immunol* **155**, 4604-12.
- Kather H. (1982) Sodium ions discriminate between stimulatory and inhibitory effects of prostaglandin E2 on human fat cell adenylate cyclase. *Prostaglandins Leukot Med* **9**, 531-7.
- Kean W. F., Rainsford K. D. and Kean I. R. (2008) Management of chronic musculoskeletal pain in the elderly: opinions on oral medication use. *Inflammopharmacology* **16**, 53-75.
- Kim M., Carman C. V. and Springer T. A. (2003) Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* **301**, 1720-5.
- Kinashi T., Aker M., Sokolovsky-Eisenberg M., Grabovsky V., Tanaka C., Shamri R., Feigelson S., Etzioni A. and Alon R. (2004) LAD-III, a leukocyte adhesion deficiency syndrome associated with defective Rap1 activation and impaired stabilization of integrin bonds. *Blood* **103**, 1033-6.
- Kobayashi S. D., Braughton K. R., Whitney A. R., Voyich J. M., Schwan T. G., Musser J. M. and DeLeo F. R. (2003) Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10948-53.

- Kobayashi Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* **88**, 1157-62.
- Kowenz-Leutz E., Twamley G., Ansieau S. and Leutz A. (1994) Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: activation through derepression. *Genes Dev* **8**, 2781-91.
- Kudo I. and Murakami M. (2002) Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 3-58.
- Kuehn H. S., Radinger M., Brown J. M., Ali K., Vanhaesebroeck B., Beaven M. A., Metcalfe D. D. and Gilfillan A. M. Btk-dependent Rac activation and actin rearrangement following FcepsilonRI aggregation promotes enhanced chemotactic responses of mast cells. *J Cell Sci* **123**, 2576-85.
- Kunkel S. L., Spengler M., May M. A., Spengler R., Larrick J. and Remick D. (1988) Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J Biol Chem* **263**, 5380-4.
- Kuziel W. A., Morgan S. J., Dawson T. C., Griffin S., Smithies O., Ley K. and Maeda N. (1997) Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12053-8.
- Lai L. H. and Chan F. K. (2009) Nonsteroid anti-inflammatory drug-induced gastroduodenal injury. *Curr Opin Gastroenterol* **25**, 544-8.
- Lang S., Lauffer L., Clausen C., Lohr I., Schmitt B., Holzel D., Wollenberg B., Gires O., Kastenbauer E. and Zeidler R. (2003) Impaired monocyte function in cancer patients: restoration with a cyclooxygenase-2 inhibitor. *Faseb J* **17**, 286-8.
- Langer H. F. and Chavakis T. (2009) Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *J Cell Mol Med* **13**, 1211-20.
- Larson Y., Liu J., Stevens P. D., Li X., Li J., Evers B. M. and Gao T. Tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) regulates cell migration and polarity through activation of CDC42 and RAC1. *J Biol Chem* **285**, 24987-98.
- Lee Y. G., Lee J., Byeon S. E., Yoo D. S., Kim M. H., Lee S. Y. and Cho J. Y. Functional role of Akt in macrophage-mediated innate immunity. *Front Biosci* **16**, 517-30.
- Legler D. F., Krause P., Scandella E., Singer E. and Groettrup M. (2006) Prostaglandin E2 is generally required for human dendritic cell migration and exerts its effect via EP2 and EP4 receptors. *J Immunol* **176**, 966-73.
- Lewis J. M. and Schwartz M. A. (1998) Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. *J Biol Chem* **273**, 14225-30.

- Lewis S. and Holmes C. (1991) Host defense mechanisms in the peritoneal cavity of continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. 1. *Perit Dial Int* **11**, 14-21.
- Ley K., Laudanna C., Cybulsky M. I. and Nourshargh S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* **7**, 678-89.
- Liang L., Hu D., Liu W., Williams J. P., Okunieff P. and Ding I. (2003) Celecoxib reduces skin damage after radiation: selective reduction of chemokine and receptor mRNA expression in irradiated skin but not in irradiated mammary tumor. *Am J Clin Oncol* **26**, S114-21.
- Linton M. F. and Fazio S. (2003) Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27 Suppl 3**, S35-40.
- Liu C., Lin J., Zhao L., Yang Y., Gao F., Li B., Cui J. and Cai J. Gamma-ray irradiation impairs dendritic cell migration to CCL19 by down-regulation of CCR7 and induction of cell apoptosis. *Int J Biol Sci* **7**, 168-79.
- Liu K., Victora G. D., Schwickert T. A., Guernonprez P., Meredith M. M., Yao K., Chu F. F., Randolph G. J., Rudensky A. Y. and Nussenzweig M. (2009) In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* **324**, 392-7.
- Liu L., Puri K. D., Penninger J. M. and Kubes P. (2007a) Leukocyte PI3Kgamma and PI3Kdelta have temporally distinct roles for leukocyte recruitment in vivo. *Blood* **110**, 1191-8.
- Liu Q., Chen T., Chen G., Shu X., Sun A., Ma P., Lu L. and Cao X. (2007b) Triptolide impairs dendritic cell migration by inhibiting CCR7 and COX-2 expression through PI3-K/Akt and NF-kappaB pathways. *Mol Immunol* **44**, 2686-96.
- Loetscher P., Seitz M., Baggiolini M. and Moser B. (1996) Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J Exp Med* **184**, 569-77.
- Loffler I., Grun M., Bohmer F. D. and Rubio I. (2008) Role of cAMP in the promotion of colorectal cancer cell growth by prostaglandin E2. *BMC Cancer* **8**, 380.
- Lopez-Parra M., Claria J., Planaguma A., Titos E., Masferrer J. L., Woerner B. M., Koki A. T., Jimenez W., Altuna R., Arroyo V., Rivera F. and Rodes J. (2002) Cyclooxygenase-1 derived prostaglandins are involved in the maintenance of renal function in rats with cirrhosis and ascites. *Br J Pharmacol* **135**, 891-900.
- Lu H., Smith C. W., Perrard J., Bullard D., Tang L., Shappell S. B., Entman M. L., Beaudet A. L. and Ballantyne C. M. (1997) LFA-1 is sufficient in mediating neutrophil emigration in Mac-1-deficient mice. *J Clin Invest* **99**, 1340-50.
- Lucas A. D. and Greaves D. R. (2001) Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages. *Expert Rev Mol Med* **3**, 1-18.

- Luster A. D., Alon R. and von Andrian U. H. (2005) Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* **6**, 1182-90.
- Ma A. D., Metjian A., Bagrodia S., Taylor S. and Abrams C. S. (1998) Cytoskeletal reorganization by G protein-coupled receptors is dependent on phosphoinositide 3-kinase gamma, a Rac guanosine exchange factor, and Rac. *Mol Cell Biol* **18**, 4744-51.
- Mackay C. R. (2008) Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat Immunol* **9**, 988-98.
- Machesky L. M. and Hall A. (1996) Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **6**, 304-10.
- Manickasingham S. P. and Reis e Sousa C. (2001) Mature T cell seeks antigen for meaningful relationship in lymph node. *Immunology* **102**, 381-6.
- Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A. and Locati M. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25**, 677-86.
- Martinez F. O., Sica A., Mantovani A. and Locati M. (2008) Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* **13**, 453-61.
- Matsuoka T. and Narumiya S. (2007) Prostaglandin receptor signaling in disease. *ScientificWorldJournal* **7**, 1329-47.
- McCracken J. A., Glew M. E. and Scaramuzzi R. J. (1970) Corpus luteum regression induced by prostaglandin in F2-alpha. *J Clin Endocrinol Metab* **30**, 544-6.
- McLean G. W., Carragher N. O., Avizienyte E., Evans J., Brunton V. G. and Frame M. C. (2005) The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer* **5**, 505-15.
- Meng F. and Lowell C. A. (1998) A beta 1 integrin signaling pathway involving Src-family kinases, Cbl and PI-3 kinase is required for macrophage spreading and migration. *Embo J* **17**, 4391-403.
- Meric J. B., Rottey S., Olaussen K., Soria J. C., Khayat D., Rixe O. and Spano J. P. (2006) Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol* **59**, 51-64.
- Milano S., Arcoleo F., Dieli M., D'Agostino R., D'Agostino P., De Nucci G. and Cillari E. (1995) Prostaglandin E2 regulates inducible nitric oxide synthase in the murine macrophage cell line J774. *Prostaglandins* **49**, 105-15.
- Mitchell J. A. and Evans T. W. (1998) Cyclooxygenase-2 as a therapeutic target. *Inflamm Res* **47 Suppl 2**, S88-92.

- Mitra S. K., Hanson D. A. and Schlaepfer D. D. (2005) Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 56-68.
- Mizia-Stec K., Zahorska-Markiewicz B., Mandecki T., Janowska J., Szulc A. and Jastrzebska-Maj E. (2002) Serum levels of selected adhesion molecules in patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol* **83**, 143-50.
- Mosheimer B. A., Kaneider N. C., Feistritz C., Djanani A. M., Sturn D. H., Patsch J. R. and Wiedermann C. J. (2005) Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 2964-71.
- Mosser D. M. (2003) The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* **73**, 209-12.
- Nakamura K., Yano H., Schaefer E. and Sabe H. (2001) Different modes and qualities of tyrosine phosphorylation of Fak and Pyk2 during epithelial-mesenchymal transdifferentiation and cell migration: analysis of specific phosphorylation events using site-directed antibodies. *Oncogene* **20**, 2626-35.
- Nakayama T., Mutsuga N., Yao L. and Tosato G. (2006) Prostaglandin E2 promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells. *J Leukoc Biol* **79**, 95-104.
- Nikolic T., de Bruijn M. F., Lutz M. B. and Leenen P. J. (2003) Developmental stages of myeloid dendritic cells in mouse bone marrow. *Int Immunol* **15**, 515-24.
- Nishigaki N., Negishi M. and Ichikawa A. (1996) Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. *Mol Pharmacol* **50**, 1031-7.
- Noti J. D. and Reinemann B. C. (1995) The leukocyte integrin gene CD11c is transcriptionally regulated during monocyte differentiation. *Mol Immunol* **32**, 361-9.
- Pahl H. L., Rosmarin A. G. and Tenen D. G. (1992) Characterization of the myeloid-specific CD11b promoter. *Blood* **79**, 865-70.
- Panzer U. and Uguccioni M. (2004) Prostaglandin E2 modulates the functional responsiveness of human monocytes to chemokines. *Eur J Immunol* **34**, 3682-9.
- Papakonstanti E. A., Ridley A. J. and Vanhaesebroeck B. (2007) The p110delta isoform of PI 3-kinase negatively controls RhoA and PTEN. *Embo J* **26**, 3050-61.
- Papakonstanti E. A., Zwaenepoel O., Bilancio A., Burns E., Nock G. E., Houseman B., Shokat K., Ridley A. J. and Vanhaesebroeck B. (2008) Distinct roles of class IA PI3K isoforms in primary and immortalised macrophages. *J Cell Sci* **121**, 4124-33.
- Pavlovic S., Du B., Sakamoto K., Khan K. M., Natarajan C., Breyer R. M., Dannenberg A. J. and Falcone D. J. (2006) Targeting prostaglandin E2 receptors

as an alternative strategy to block cyclooxygenase-2-dependent extracellular matrix-induced matrix metalloproteinase-9 expression by macrophages. *J Biol Chem* **281**, 3321-8.

- Pelegrin P. and Surprenant A. (2009) Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1 β release through pyrophosphates. *Embo J* **28**, 2114-27.
- Pierce K. L., Fujino H., Srinivasan D. and Regan J. W. (1999) Activation of FP prostanoid receptor isoforms leads to Rho-mediated changes in cell morphology and in the cell cytoskeleton. *J Biol Chem* **274**, 35944-9.
- Potteaux S., Gautier E. L., Hutchison S. B., van Rooijen N., Rader D. J., Thomas M. J., Sorci-Thomas M. G. and Randolph G. J. Suppressed monocyte recruitment drives macrophage removal from atherosclerotic plaques of Apoe^{-/-} mice during disease regression. *J Clin Invest* **121**, 2025-36.
- Pype S., Declercq W., Ibrahimi A., Michiels C., Van Rietschoten J. G., Dewulf N., de Boer M., Vandenabeele P., Huylebroeck D. and Remacle J. E. (2000) TTRAP, a novel protein that associates with CD40, tumor necrosis factor (TNF) receptor-75 and TNF receptor-associated factors (TRAFs), and that inhibits nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* **275**, 18586-93.
- Qu C., Edwards E. W., Tacke F., Angeli V., Llodra J., Sanchez-Schmitz G., Garin A., Haque N. S., Peters W., van Rooijen N., Sanchez-Torres C., Bromberg J., Charo I. F., Jung S., Lira S. A. and Randolph G. J. (2004) Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. *J Exp Med* **200**, 1231-41.
- Radmark O. and Samuelsson B. (2005) Regulation of 5-lipoxygenase enzyme activity. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 102-10.
- Rajakariar R., Yaqoob M. M. and Gilroy D. W. (2006) COX-2 in inflammation and resolution. *Mol Interv* **6**, 199-207.
- Rameh L. E. and Cantley L. C. (1999) The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* **274**, 8347-50.
- Randolph G. J. (2008) Emigration of monocyte-derived cells to lymph nodes during resolution of inflammation and its failure in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **19**, 462-8.
- Rao R., Redha R., Macias-Perez I., Su Y., Hao C., Zent R., Breyer M. D. and Pozzi A. (2007) Prostaglandin E2-EP4 receptor promotes endothelial cell migration via ERK activation and angiogenesis in vivo. *J Biol Chem* **282**, 16959-68.
- Regan J. W. (2003) EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. *Life Sci* **74**, 143-53.

- Reif K., Nobes C. D., Thomas G., Hall A. and Cantrell D. A. (1996) Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways. *Curr Biol* **6**, 1445-55.
- Rollins B. J. (1997) Chemokines. *Blood* **90**, 909-28.
- Rosas-Taraco A. G., Higgins D. M., Sanchez-Campillo J., Lee E. J., Orme I. M. and Gonzalez-Juarrero M. (2009a) Intrapulmonary delivery of XCL1-targeting small interfering RNA in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Cell Mol Biol* **41**, 136-45.
- Rosas-Taraco A. G., Salinas-Carmona M. C., Revol A., Rendon A., Caballero-Olin G. and Arce-Mendoza A. Y. (2009b) Expression of CD11c in blood monocytes as biomarker for favorable response to antituberculosis treatment. *Arch Med Res* **40**, 128-31.
- Rosmarin A. G., Weil S. C., Rosner G. L., Griffin J. D., Arnaout M. A. and Tenen D. G. (1989) Differential expression of CD11b/CD18 (Mo1) and myeloperoxidase genes during myeloid differentiation. *Blood* **73**, 131-6.
- Ross G. D., Reed W., Dalzell J. G., Becker S. E. and Hogg N. (1992) Macrophage cytoskeleton association with CR3 and CR4 regulates receptor mobility and phagocytosis of iC3b-opsonized erythrocytes. *J Leukoc Biol* **51**, 109-17.
- Rotondo D., Abul H. T., Milton A. S. and Davidson J. (1988) Pyrogenic immunomodulators increase the level of prostaglandin E2 in the blood simultaneously with the onset of fever. *Eur J Pharmacol* **154**, 145-52.
- Ryan E. P., Malboeuf C. M., Bernard M., Rose R. C. and Phipps R. P. (2006) Cyclooxygenase-2 inhibition attenuates antibody responses against human papillomavirus-like particles. *J Immunol* **177**, 7811-9.
- Sadik C. D., Kim N. D. and Luster A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol* **32**, 452-60.
- Sampey A. V., Monrad S. and Crofford L. J. (2005) Microsomal prostaglandin E synthase-1: the inducible synthase for prostaglandin E2. *Arthritis Res Ther* **7**, 114-7.
- Samuelsson B., Morgenstern R. and Jakobsson P. J. (2007) Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev* **59**, 207-24.
- Sandig H., Andrew D., Barnes A. A., Sabroe I. and Pease J. (2006) 9alpha,11beta-PGF2 and its stereoisomer PGF2alpha are novel agonists of the chemoattractant receptor, CTRH2. *FEBS Lett* **580**, 373-9.
- Scandella E., Men Y., Gillessen S., Forster R. and Groettrup M. (2002) Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **100**, 1354-61.

- Scott L. M., Civin C. I., Rorth P. and Friedman A. D. (1992) A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood* **80**, 1725-35.
- Schaller M. D. (2001) Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* **20**, 6459-72.
- Schlaepfer D. D., Hanks S. K., Hunter T. and van der Geer P. (1994) Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* **372**, 786-91.
- Schuligoi R., Sedej M., Waldhoer M., Vukoja A., Sturm E. M., Lippe I. T., Peskar B. A. and Heinemann A. (2009) Prostaglandin H2 induces the migration of human eosinophils through the chemoattractant receptor homologous molecule of Th2 cells, CRTH2. *J Leukoc Biol* **85**, 136-45.
- Sellmayer A., Goessl C., Obermeier H., Volk R., Reder E., Weber C. and Weber P. C. (1994) Differential induction of eicosanoid synthesis in monocytic cells treated with retinoic acid and 1,25-dihydroxy-vitamin D3. *Prostaglandins* **47**, 203-20.
- Serbina N. V., Salazar-Mather T. P., Biron C. A., Kuziel W. A. and Pamer E. G. (2003) TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* **19**, 59-70.
- Shelley C. S., Teodoridis J. M., Park H., Farokhzad O. C., Bottinger E. P. and Arnaout M. A. (2002) During differentiation of the monocytic cell line U937, Pur alpha mediates induction of the CD11c beta 2 integrin gene promoter. *J Immunol* **168**, 3887-93.
- Shibata T., Nagata K. and Kobayashi Y. Apoptotic neutrophils and nitric oxide regulate cytokine production by IFN-gamma-stimulated macrophages. *Cytokine* **53**, 191-5.
- Shiratsuchi H. and Basson M. D. (2007) Akt2, but not Akt1 or Akt3 mediates pressure-stimulated serum-opsonized latex bead phagocytosis through activating mTOR and p70 S6 kinase. *J Cell Biochem* **102**, 353-67.
- Simmons D. L., Botting R. M. and Hla T. (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* **56**, 387-437.
- Smith W. L., DeWitt D. L. and Garavito R. M. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* **69**, 145-82.
- Smith W. L. and Langenbach R. (2001) Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* **107**, 1491-5.
- Smyth E. M., Grosser T., Wang M., Yu Y. and FitzGerald G. A. (2009) Prostanoids in health and disease. *J Lipid Res* **50 Suppl**, S423-8.

- Soehnlein O., Lindbom L. and Weber C. (2009) Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood* **114**, 4613-23.
- Sonnenburg W. K., Zhu J. H. and Smith W. L. (1990) A prostaglandin E receptor coupled to a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide regulatory protein in rabbit cortical collecting tubule cells. *J Biol Chem* **265**, 8479-83.
- Sotsios Y. and Ward S. G. (2000) Phosphoinositide 3-kinase: a key biochemical signal for cell migration in response to chemokines. *Immunol Rev* **177**, 217-35.
- Springer T., Galfre G., Secher D. S. and Milstein C. (1979) Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol* **9**, 301-6.
- Springer T. A. (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**, 425-34.
- Springer T. A., Miller L. J. and Anderson D. C. (1986) p150,95, the third member of the Mac-1, LFA-1 human leukocyte adhesion glycoprotein family. *J Immunol* **136**, 240-5.
- Sreeramkumar V., Fresno M. and Cuesta N. Prostaglandin E2 and T cells: friends or foes? *Immunol Cell Biol* **90**, 579-86.
- Stables M. J., Shah S., Camon E. B., Lovering R. C., Newson J., Bystrom J., Farrow S. and Gilroy D. W. Transcriptomic analyses of murine resolution-phase macrophages. *Blood* **118**, e192-208.
- Stacker S. A. and Springer T. A. (1991) Leukocyte integrin P150,95 (CD11c/CD18) functions as an adhesion molecule binding to a counter-receptor on stimulated endothelium. *J Immunol* **146**, 648-55.
- Stein R. C. and Waterfield M. D. (2000) PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol Med Today* **6**, 347-57.
- Stephens L., Anderson K., Stokoe D., Erdjument-Bromage H., Painter G. F., Holmes A. B., Gaffney P. R., Reese C. B., McCormick F., Tempst P., Coadwell J. and Hawkins P. T. (1998) Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* **279**, 710-4.
- Sunderkotter C., Nikolic T., Dillon M. J., Van Rooijen N., Stehling M., Drevets D. A. and Leenen P. J. (2004) Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* **172**, 4410-7.
- Taborda C. P. and Casadevall A. (2002) CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *Immunity* **16**, 791-802.

- Tajima T., Murata T., Aritake K., Urade Y., Hirai H., Nakamura M., Ozaki H. and Hori M. (2008) Lipopolysaccharide induces macrophage migration via prostaglandin D(2) and prostaglandin E(2). *J Pharmacol Exp Ther* **326**, 493-501.
- Tanabe T. and Tohnai N. (2002) Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 95-114.
- Tang L., Ugarova T. P., Plow E. F. and Eaton J. W. (1996) Molecular determinants of acute inflammatory responses to biomaterials. *J Clin Invest* **97**, 1329-34.
- Taylor P. R., Martinez-Pomares L., Stacey M., Lin H. H., Brown G. D. and Gordon S. (2005) Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* **23**, 901-44.
- Thoren S. and Jakobsson P. J. (2000) Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4. *Eur J Biochem* **267**, 6428-34.
- Tomar A. and Schlaepfer D. D. (2009) Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 676-83.
- Topley N., Mackenzie R., Jorres A., Coles G. A., Davies M. and Williams J. D. (1993) Cytokine networks in continuous ambulatory peritoneal dialysis: interactions of resident cells during inflammation in the peritoneal cavity. *Perit Dial Int* **13 Suppl 2**, S282-5.
- Torroella-Kouri M., Silvera R., Rodriguez D., Caso R., Shatry A., Opiela S., Ilkovitch D., Schwendener R. A., Iragavarapu-Charyulu V., Cardentey Y., Strbo N. and Lopez D. M. (2009) Identification of a subpopulation of macrophages in mammary tumor-bearing mice that are neither M1 nor M2 and are less differentiated. *Cancer Res* **69**, 4800-9.
- Toutant M., Costa A., Studler J. M., Kadare G., Carnaud M. and Girault J. A. (2002) Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation. *Mol Cell Biol* **22**, 7731-43.
- Turner C. E. (2000) Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol* **2**, E231-6.
- Tybulewicz V. L. and Henderson R. B. (2009) Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **9**, 630-44.
- Uematsu S., Matsumoto M., Takeda K. and Akira S. (2002) Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J Immunol* **168**, 5811-6.
- Vadas O., Burke J. E., Zhang X., Berndt A. and Williams R. L. Structural basis for activation and inhibition of class I phosphoinositide 3-kinases. *Sci Signal* **4**, re2.

- Van Furth R., Diesselhoff-den Dulk M. C. and Mattie H. (1973) Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. *J Exp Med* **138**, 1314-30.
- van Gils J. M., Derby M. C., Fernandes L. R., Ramkhelawon B., Ray T. D., Rayner K. J., Parathath S., Distel E., Feig J. L., Alvarez-Leite J. I., Rayner A. J., McDonald T. O., O'Brien K. D., Stuart L. M., Fisher E. A., Lacy-Hulbert A. and Moore K. J. The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. *Nat Immunol* **13**, 136-43.
- van Helden S. F., Krooshoop D. J., Broers K. C., Raymakers R. A., Figdor C. G. and van Leeuwen F. N. (2006) A critical role for prostaglandin E2 in podosome dissolution and induction of high-speed migration during dendritic cell maturation. *J Immunol* **177**, 1567-74.
- van Kooyk Y. and Figdor C. G. (2000) Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 542-7.
- Vicente-Manzanares M., Sancho D., Yanez-Mo M. and Sanchez-Madrid F. (2002) The leukocyte cytoskeleton in cell migration and immune interactions. *Int Rev Cytol* **216**, 233-89.
- Vila-del Sol V., Diaz-Munoz M. D. and Fresno M. (2007) Requirement of tumor necrosis factor alpha and nuclear factor-kappaB in the induction by IFN-gamma of inducible nitric oxide synthase in macrophages. *J Leukoc Biol* **81**, 272-83.
- Vila-del Sol V. and Fresno M. (2005) Involvement of TNF and NF-kappa B in the transcriptional control of cyclooxygenase-2 expression by IFN-gamma in macrophages. *J Immunol* **174**, 2825-33.
- Wallace A. E., Sales K. J., Catalano R. D., Anderson R. A., Williams A. R., Wilson M. R., Schwarze J., Wang H., Rossi A. G. and Jabbour H. N. (2009) Prostaglandin F2alpha-F-prostanoid receptor signaling promotes neutrophil chemotaxis via chemokine (C-X-C motif) ligand 1 in endometrial adenocarcinoma. *Cancer Res* **69**, 5726-33.
- Wang D. and Dubois R. N. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* **29**, 781-8.
- Wang R. F., Camras C. B., Lee P. Y., Podos S. M. and Bito L. Z. (1990) Effects of prostaglandins F2 alpha, A2, and their esters in glaucomatous monkey eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **31**, 2466-70.
- Wang R. F., Camras C. B., Podos S. M., Lee K. W., Bhuyan K. C. and Bhuyan D. K. (1989) The role of prostaglandins in the para-aminoclonidine-induced reduction of intraocular pressure. *Trans Am Ophthalmol Soc* **87**, 94-104; discussion 104-6.
- Weber C., Belge K. U., von Hundelshausen P., Draude G., Steppich B., Mack M., Frankenberger M., Weber K. S. and Ziegler-Heitbrock H. W. (2000) Differential

chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol* **67**, 699-704.

- Weber K. S., Klickstein L. B. and Weber C. (1999) Specific activation of leukocyte beta2 integrins lymphocyte function-associated antigen-1 and Mac-1 by chemokines mediated by distinct pathways via the alpha subunit cytoplasmic domains. *Mol Biol Cell* **10**, 861-73.
- Welch H. C., Coadwell W. J., Stephens L. R. and Hawkins P. T. (2003) Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett* **546**, 93-7.
- Weninger W., Crowley M. A., Manjunath N. and von Andrian U. H. (2001) Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *J Exp Med* **194**, 953-66.
- Wong M. M. and Fish E. N. (2003) Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol* **15**, 5-14.
- Worthylake R. A. and Burridge K. (2001) Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 569-77.
- Wu H., Gower R. M., Wang H., Perrard X. Y., Ma R., Bullard D. C., Burns A. R., Paul A., Smith C. W., Simon S. I. and Ballantyne C. M. (2009) Functional role of CD11c+ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia. *Circulation* **119**, 2708-17.
- Wu H., Perrard X. D., Wang Q., Perrard J. L., Polsani V. R., Jones P. H., Smith C. W. and Ballantyne C. M. CD11c expression in adipose tissue and blood and its role in diet-induced obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 186-92.
- Wu M. H., Shoji Y., Wu M. C., Chuang P. C., Lin C. C., Huang M. F. and Tsai S. J. (2005) Suppression of matrix metalloproteinase-9 by prostaglandin E(2) in peritoneal macrophage is associated with severity of endometriosis. *Am J Pathol* **167**, 1061-9.
- Xie H., Lim Y. C., Luscinskas F. W. and Lichtman A. H. (1999) Acquisition of selectin binding and peripheral homing properties by CD4(+) and CD8(+) T cells. *J Exp Med* **189**, 1765-76.
- Yamada K. M. and Miyamoto S. (1995) Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 681-9.
- Yamazaki T., Nagata K. and Kobayashi Y. (2008) Cytokine production by M-CSF- and GM-CSF-induced mouse bone marrow-derived macrophages upon coculturing with late apoptotic cells. *Cell Immunol* **251**, 124-30.
- Yao C., Sakata D., Esaki Y., Li Y., Matsuoka T., Kuroiwa K., Sugimoto Y. and Narumiya S. (2009) Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat Med* **15**, 633-40.

- Yedgar S., Krinsky M., Cohen Y. and Flower R. J. (2007) Treatment of inflammatory diseases by selective eicosanoid inhibition: a double-edged sword? *Trends Pharmacol Sci* **28**, 459-64.
- Yen J. H., Khayrullina T. and Ganea D. (2008) PGE2-induced metalloproteinase-9 is essential for dendritic cell migration. *Blood* **111**, 260-70.
- Zaidel-Bar R., Itzkovitz S., Ma'ayan A., Iyengar R. and Geiger B. (2007) Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol* **9**, 858-67.
- Zeidler R., Csanady M., Gires O., Lang S., Schmitt B. and Wollenberg B. (2000) Tumor cell-derived prostaglandin E2 inhibits monocyte function by interfering with CCR5 and Mac-1. *Faseb J* **14**, 661-8.
- Zhang B., Ma Y., Guo H., Sun B., Niu R., Ying G. and Zhang N. (2009) Akt2 is required for macrophage chemotaxis. *Eur J Immunol* **39**, 894-901.

Material
suplementario

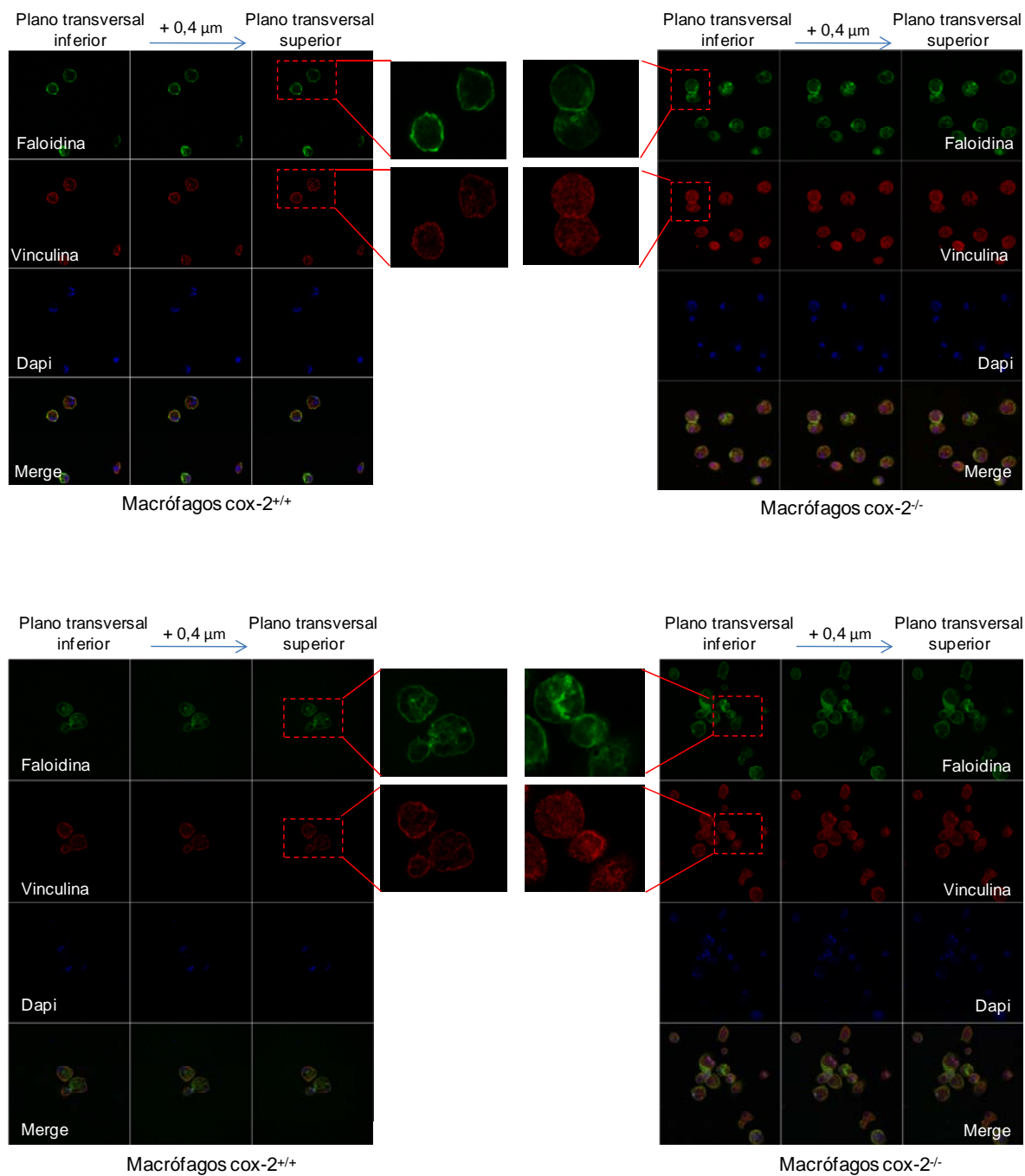


Figura 1 suplementaria. Análisis de la formación de las adhesiones focales en macrófagos peritoneales *cox-2*^{+/+} y *cox-2*^{-/-}.

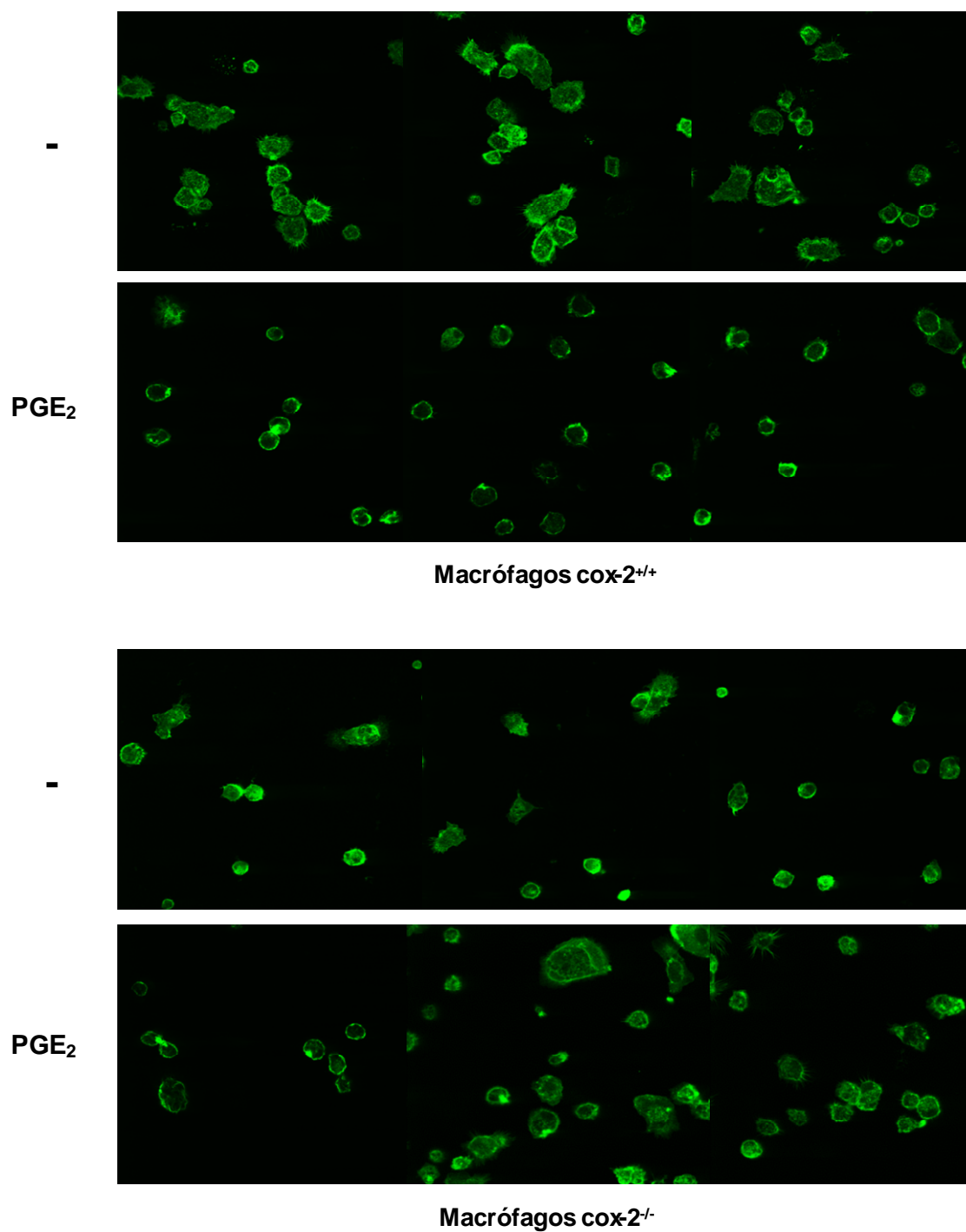


Figura 2 suplementaria. Análisis del efecto de PGE_2 en el citoesquelto de actina en macrófagos peritoneales *cox-2^{+/+}* y *cox-2^{-/-}*.

Involvement of PGE₂ and the cAMP signalling pathway in the up-regulation of COX-2 and mPGES-1 expression in LPS-activated macrophages

Manuel D. DÍAZ-MUÑOZ¹, Inés C. OSMA-GARCÍA, Manuel FRESNO² and Miguel A. IÑIGUEZ^{2,3}

Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid and Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Nicolás Cabrera 1, Cantoblanco, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

PG (prostaglandin) E₂ plays an important role in the modulation of the immune response and the inflammatory process. In the present study, we describe a PGE₂ positive feedback for COX (cyclo-oxygenase)-2 and mPGES-1 [microsomal PGES (PGE synthase)-1] expression in the macrophage cell line RAW 264.7. Our results show that PGE₂ induces COX-2 and mPGES-1 expression, an effect mimicked by dbcAMP (dibutyryl-cAMP) or forskolin. Furthermore, the cAMP signalling pathway co-operates with LPS (lipopolysaccharide) in the induction of COX-2 and mPGES-1 transcriptional activation. Analysis of the involvement of PGE receptors [EPs (E-prostanoids)] showed that incubation with EP2 agonists up-regulated both *COX2* and *mPGES-1* mRNA levels. Moreover, EP2 receptor overexpression enhanced the transcriptional activation of *COX2* and *mPGES-1* promoters. This induction was repressed by the PKA (protein

kinase A) inhibitor H89. Activation of the PGE₂/EP2/PKA signalling pathway induced the phosphorylation of CREB [CRE (cAMP-response element)-binding protein] in macrophages and stimulated the specific binding of this transcription factor to *COX2* and *mPGES-1* promoters. Deletion or mutation of potential CRE sites in both promoters diminished their transcriptional activity. In summary, the results of the present study demonstrate that activation of PKA/CREB signalling through the EP2 receptor by PGE₂ plays a key role in the expression of COX-2 and mPGES-1 in activated macrophages.

Key words: cyclo-oxygenase-2 (COX-2), E-prostanoid (EP) receptor, gene regulation, inflammation, lipid mediator, microsomal prostaglandin E synthase 1 (mPGES-1).

INTRODUCTION

PGs (prostaglandins) and TXs (thromboxanes) are important lipid mediators involved in physiological and pathological processes. These agents are generated from the conversion of AA (arachidonic acid) into the intermediate mediator PGH₂ by two different COXs (cyclo-oxygenases), COX-1 and COX-2 (reviewed in [1,2]). These enzymes are the target of NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) [3]. COX-1 has been defined as a constitutive enzyme that generates PGs within physiological homeostasis. In contrast, COX-2 is an inducible enzyme responsible for PG production in different pathological processes involving inflammation, such as infectious diseases, cancer, arthritis and atherosclerosis [4–7]. PGH₂ is the substrate of different PG and TX synthases that, in turn, generate a range of prostanoids with potent and diverse biological effects, such as PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ and TXA₂. Three types of PGESs (PGE synthases) participating in the synthesis of PGE₂ have been described: one cPGES (cytosolic PGES) and two membrane-associated PGESs, mPGES (microsomal PGES)-1 and -2 [3,8]. mPGES-1, which belongs to the MAPEG (membrane-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism) superfamily, is inducible by similar stimuli that induce COX-2, its induction also being suppressed by glucocorticoids. Moreover, mPGES-1 appears to be functionally coupled with COX-2 and its induction is usually co-ordinated with COX-2 [9]. In macrophages, large amounts of PGE₂ are generated during the

inflammatory process, due to up-regulation of both COX-2 and mPGES-1 enzymes. Co-ordinated induction of the expression of COX-2 and mPGES-1 by pro-inflammatory stimuli, such as LPS (lipopolysaccharide), IL (interleukin)-1β or TNFα (tumour necrosis factor α), has been reported in several cell types [10–13].

Prostanoids released into the extracellular medium exert their biological effects in an autocrine or paracrine fashion upon interaction with prostanoid receptors present in target cells. PGE₂ signals through four G-protein-coupled receptors named EP (E-prostanoid) 1, EP2, EP3 and EP4 (reviewed in [14–17]). EP receptors are linked to different transduction pathways that may even give rise to opposite effects, i.e. activation or inhibition, on cellular responses. Thus EP3 induces the inhibition of adenylate cyclase, leading to a decrease in cAMP, whereas EP2 and EP4 receptors activate this enzyme. On the other hand, EP1 is coupled to G_{αq} and its activation results in an increase in intracellular calcium.

cAMP is thought to be the main intracellular second messenger of PGE₂ signalling in macrophages, playing a crucial role in the modulation of the functional activity of macrophages and monocytes. In fact, PGE₂-dependent elevation of intracellular cAMP in LPS-stimulated macrophages results in a decreased synthesis of pro-inflammatory cytokines, including TNFα [18,19] and IL-1β [20], and in an increased production of the inflammatory cytokine IL-10 [21]. On the other hand, stimuli known to elevate intracellular cAMP levels, such as PGE₂, may positively modulate COX-2 expression [22,23].

Abbreviations used: ChIP, chromatin immunoprecipitation; COX, cyclo-oxygenase; dbcAMP, dibutyryl-cAMP; CRE, cAMP-response element; CREB, CRE-binding protein; EGR-1, early growth-response gene product 1; EIA, enzyme immunoassay; EP, E-prostanoid; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; NF-κB, nuclear factor κB; NP-40, Nonidet P40; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug; PG, prostaglandin; PGES, PGE synthase; mPGES-1, microsomal PGES-1; cPGES, cytosolic PGES; PGHS, PGH endoperoxide synthase; PKA, protein kinase A; RLU, relative luminescence unit; RQ, relative quantification; RT, reverse transcription; TNFα, tumour necrosis factor α; TX, thromboxane.

¹ Present address: The Babraham Institute, Babraham Research Campus, Cambridge CB22 3AT, U.K.

² These authors contributed equally to this work as co-senior authors.

³ To whom correspondence should be addressed (email mainiguez@cbm.uam.es).

We have previously reported an essential role of NF- κ B (nuclear factor κ B) and EGR-1 (early growth-response gene product 1) as key factors involved in co-ordinated up-regulation of COX-2 and mPGES-1 expression in macrophages in response to LPS, leading to increased PGE₂ production [13]. In the present study, we explore the importance of cAMP signalling in the regulation of COX-2 and mPGES-1 in LPS-stimulated macrophages, analysing the role of PGE₂-dependent signalling. Our results show that PGE₂ induces transcriptional activation of both COX-2 and mPGES-1 via mechanisms involving EP2 receptor activation and the cAMP/PKA (protein kinase A)/CREB [CRE (cAMP-response element)-binding protein] signalling pathway. This positive-feedback regulation of the PGE₂-synthesizing enzymes COX-2 and mPGES-1 in macrophages constitutes an amplification signalling that may play an important role in the modulation of the inflammatory process and the immune response.

EXPERIMENTAL

Cell culture and reagents

The mouse macrophage cell line RAW 264.7 (A.T.C.C., Rockville, MD, U.S.A.) was cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 5% fetal calf serum (Lonza), 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 1000 units/ml gentamycin, 2 mM L-glutamine and 0.1 mM non-essential amino acids. Cells were treated with LPS from *Escherichia coli* serotype 026:B6 (Sigma–Aldrich) at 1 μ g/ml. The selective COX-2 inhibitors Celecoxib and NS398 (Alexis Biochemicals) were used at final concentrations between 0.01 and 1 μ M. The PGE₂, EP2 and EP4 agonists CAY10399 and PGE₁OH, and the EP2 antagonist AH6809, were purchased from Cayman Chemical. dbcAMP (dibutyryl-cAMP; 100 μ M) and forskolin (10 μ M) were from Sigma. NSAIDs and PKA inhibitors H89 (10 μ M) and KT5720 (1 μ M) (Enzo Life Sciences) were added 1 h before cell stimulation with PGE₂ or LPS.

Plasmid constructs

The COX2 promoter–luciferase construct PGHS-2 Medium (–1844) (PGHS is PGH endoperoxide synthase) was provided by Dr Stephanie Vogel (University of Maryland Medical Center, Baltimore, MD, U.S.A.) [24]. PGHS-2-400 and PGHS-2-250 constructs were kindly provided by Dr Harvey Herschman (Molecular and Medical Pharmacology, University of California at Los Angeles, Los Angeles, CA, U.S.A.) [25]; PGHS-2-150, PGHS-2-88 and CRE-mutated PGHS-2-400 and PGHS-2-88 constructs were generated by Dr Virginia Vila-del Sol (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain) [26]. Luciferase constructs containing different deletions of the murine promoter of *mPGES-1* (mPGES-1-895, mPGES-1-694, mPGES-1-483 and mPGES-1-154) were as described previously [13]. The CRE-LUC (luciferase) plasmid contained four copies of the CRE site of the human choriogonadotropin gene promoter (–147 to –129) [27]. An EP2 expression vector (pcDNA 3.1-EP2) was obtained from Missouri S&T UMR cDNA Resource Center. The expression vector for the catalytic subunit of PKA was as described previously [28].

Transient transfection

COX2 and *mPGES-1* promoter activity was analysed by luciferase reporter gene assays. RAW 264.7 cells were transiently transfected with 0.5–2 μ g of the different luciferase constructs

along with 250 ng of pcDNA3 or pcDNA 3.1-EP2 plasmids using Lipofectamine™ 2000 reagent (Invitrogen). After 5 h of transfection, cells were treated with different stimuli for an additional 18 h. Then, cells were harvested and lysed, and luciferase activity was determined by using a luciferase assay kit (Promega) in a Monolight 2010 luminometer (Analytical Luminescence Laboratory). Transfection experiments were performed in triplicate. Results are expressed as mean fold induction \pm S.D. [observed experimental RLUs (relative luminescence units)/basal RLUs in the absence of any stimulus].

mRNA analysis

Total RNA was obtained from cells using the TRIzol® reagent RNA isolation protocol (Invitrogen). For standard RT (reverse transcription)–PCR, RNA (1 μ g) was reverse-transcribed by the RNA PCR core kit (PerkinElmer). cDNA was used for PCR amplification to analyse EP expression by standard RT–PCR using specific primers: EP1, sense 5'-TTAACCTGAGCCTAGCGGATG-3' and antisense 5'-CGCTGAGCGTATTGCACACTA-3'; EP2, sense 5'-CCACGATGCTCTCTGCTGCTTAT-3' and antisense 5'-CAGCCCCCTTACACTTCTCCAATGA-3'; EP3, sense 5'-TGACCTTTGCCTGCAACCTG-3' and antisense 5'-G-ACCCAGGGAAACAGGTACT-3'; EP4, sense 5'-CTTACTCATCGCCACCTCTCTGGT-3' and antisense 5'-TGTGGCTCCACTAACCTCATCCAC-3'; and β -actin, sense 5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3' and antisense 5'-GTGGGCGCTCTAGGCACCAA-3'. Template was amplified by 25–30 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 55 or 60°C for 45 s, and extension at 72°C for 45 s. PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. Results shown correspond to a number of cycles at which the amount of amplified product is proportional to the abundance of starting material.

For quantitative real-time RT–PCR analysis, total RNA was reverse-transcribed using the components of the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Amplification of the COX2 and *mPGES-1* cDNAs was performed using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) on an ABI PRISM 7900HT instrument (Applied Biosystems) for 40 cycles with specific primers and TaqMan MGB (minor groove binder) probes for COX1, COX2, *mPGES-1*, EP1, EP2, EP3, EP4 and 18S rRNA (Applied Biosystems). All samples were run in triplicate. Quantification of gene expression by real-time RT–PCR was calculated by the $\Delta\Delta C_T$ (comparative threshold cycle) method, following the manufacturer's instructions. RQ (relative quantification) of mRNA levels was determined using endogenous expression of 18S rRNA and is shown in all of the experiments as RQ \pm S.D.

Western blotting

Protein extracts were obtained as described previously [13]. Protein concentration was determined by the BCA method (Thermo Scientific). Cell lysates were subjected to Western blot analysis using conventional SDS/PAGE and protein transfer to nitrocellulose filters. Membranes were incubated with the indicated antibodies and developed by the ECL (enhanced chemiluminescence) system (Thermo Scientific). COX-2 and mPGES-1 protein expression was detected using a monoclonal anti-COX-2 antibody (BD Transduction Laboratories) and a polyclonal rabbit anti-mPGES-1 antibody (Cayman Chemical). Antibodies against CREB and pCREB were purchased from

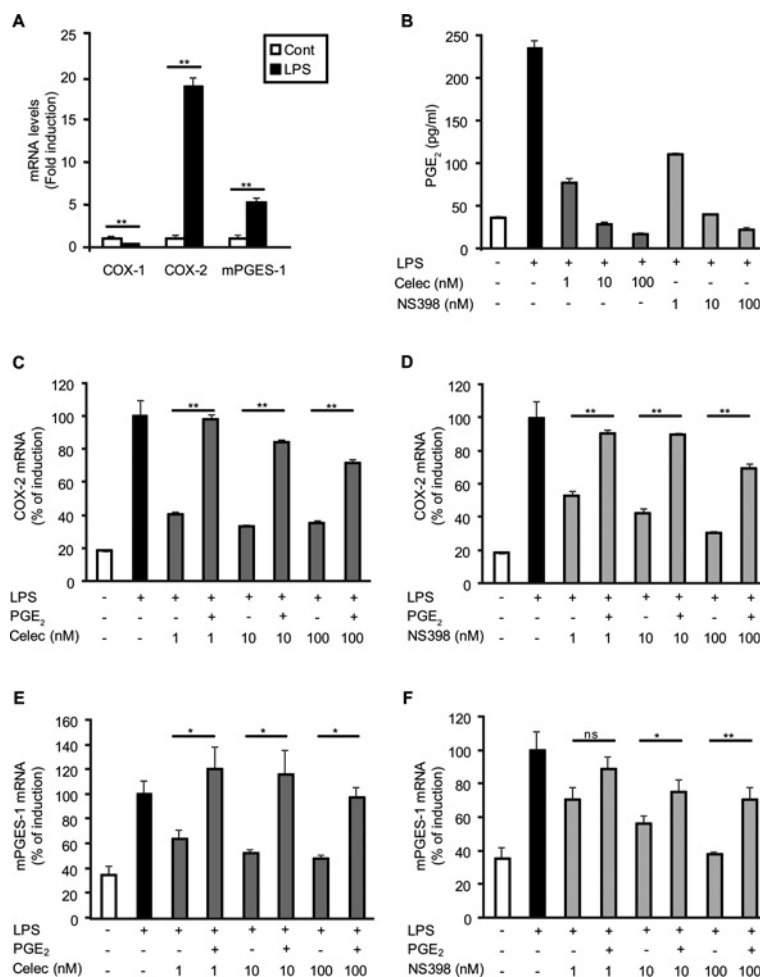


Figure 1 Inhibition of PGE₂ synthesis by COX-2-specific inhibitors reduces COX2 and mPGES-1 gene expression in macrophages

(A) RAW 264.7 cells were treated with LPS (1 µg/ml) for 24 h and COX1, COX2 and mPGES-1 mRNA levels were analysed by real-time quantitative RT-PCR, normalized to the expression of 18S rRNA. Results are shown as the fold induction ± S.D. over the levels in the absence of LPS treatment. (B) RAW 264.7 cells were treated with LPS (1 µg/ml) for 24 h in the presence or absence of increasing doses (1–100 nM) of the COX-2 inhibitors NS398 or Celecoxib (Celec). PGE₂ production in cell supernatants of RAW 264.7 cells was determined by a standard EIA assay as described in the Experimental section. Analysis of COX2 (C and D) and mPGES-1 (E and F) mRNA levels by real-time quantitative RT-PCR in RAW 264.7 cells treated with LPS for 24 h along with increasing doses (1–100 nM) of Celecoxib (C and E) or NS398 (D and F) in the presence or absence of PGE₂ (5 µM) as indicated. COX2 and mPGES-1 mRNA levels were normalized to the expression of 18S rRNA and are shown as percentage of induction ± S.D., considering the induction obtained upon LPS treatment to be 100%. **P* < 0.05; ***P* < 0.01. ns, not significant.

Upstate Signalling. The β-actin level was used as a loading control in each lane.

ChIP (chromatin immunoprecipitation) assay

Specific binding of CREB and pCREB to COX2 and mPGES-1 promoters was determined by ChIP assays as described previously [13]. Briefly, RAW 264.7 cells treated with PGE₂ (5 µM) at the indicated times were fixed with 1% formaldehyde and lysed in ice-cold lysis buffer [10 mM Hepes, pH 7.6, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT (dithiothreitol) and 0.1% NP-40 (Nonidet P40) with protease inhibitors]. The pellet of nuclei was suspended in nuclear lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 1% SDS and protease inhibitors) and then chromatin DNA was sheared by sonication. Lysates were pre-cleared with salmon sperm/Protein A-agarose. A sample of input DNA was collected. Protein-DNA complexes were immunoprecipitated overnight at 4°C with anti-CREB or anti-pCREB polyclonal antibodies or non-immune rabbit antiserum as a control. Antibody-protein-DNA complexes were incubated

with salmon sperm DNA/Protein A-agarose for 30 min followed by washes with wash buffer (20 mM Tris/HCl, pH 8, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% NP-40 and 500 mM NaCl) and TE buffer (20 mM Tris/HCl, pH 8.0, and 2 mM EDTA). Protein-DNA complexes were eluted and disrupted by incubating at 65°C followed by proteinase K treatment. DNA was extracted with a QIAquick PCR Purification kit (Qiagen). PCR was conducted using promoter-specific primers for COX2 and mPGES-1, and amplified bands were analysed by 2% agarose gel electrophoresis.

PGE₂ determination

After various treatments, PGE₂ levels were measured in culture supernatants of RAW 264.7 cells using a competitive immunoassay PGE₂ EIA (enzyme immunoassay) kit, following the manufacturer's instructions (Cayman Chemical).

Statistics

Results are expressed as means ± S.D. from at least three independent experiments performed in duplicate or triplicate.

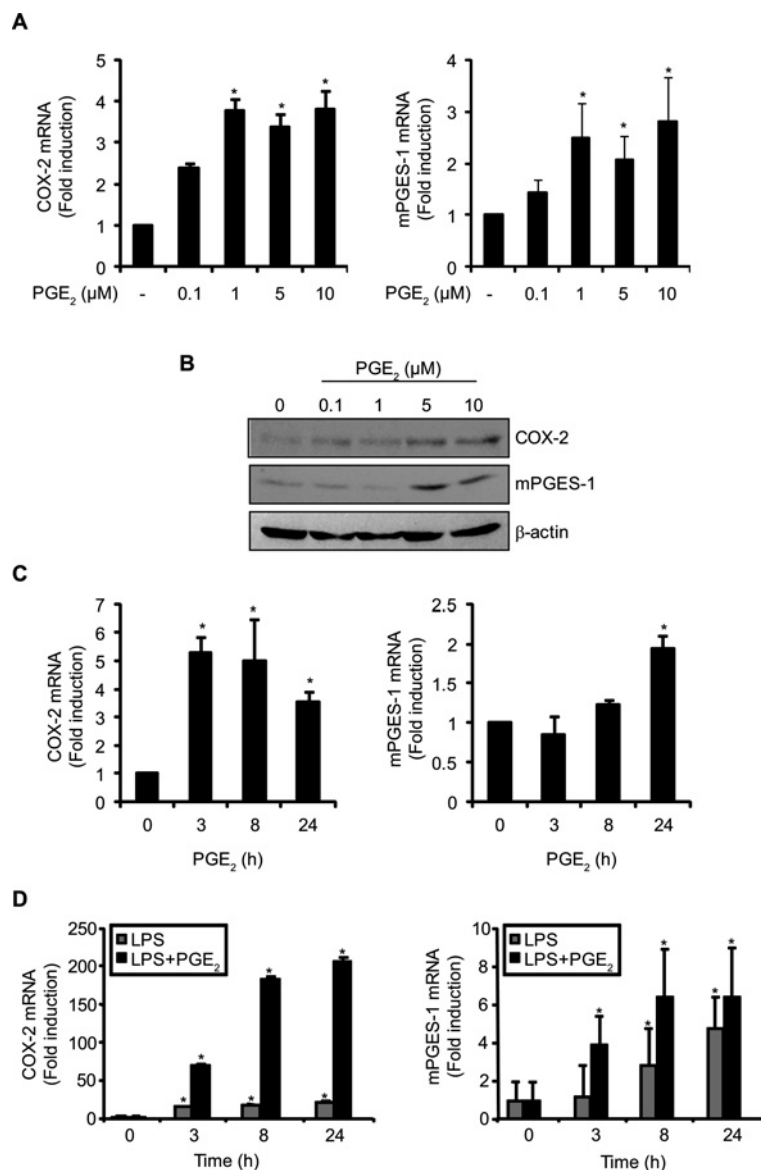


Figure 2 PGE₂ induces COX-2 and mPGES-1 synthesis in RAW 264.7 cells

(A) Dose-response effect of PGE₂ on COX-2 and mPGES-1 mRNA expression. RAW 264.7 cells were stimulated with different doses of PGE₂ (0.1–10 μM) for 24 h. (B) Analysis of COX-2 and mPGES-1 protein levels by Western blotting in extracts from RAW 264.7 cells treated with increasing doses of PGE₂. β-Actin protein levels were determined as a loading control. (C) Time course mRNA induction of COX-2 and mPGES-1 after PGE₂ treatment. RAW 264.7 cells were treated with PGE₂ (5 μM) for the times indicated (h). (D) PGE₂ co-operates with LPS to induce COX-2 and mPGES-1 expression in macrophages. RAW 264.7 cells were treated with LPS (1 μg/ml) or LPS + PGE₂ (5 μM) for different times. COX-2 and mPGES-1 mRNA levels were analysed by real-time RT-PCR and normalized to the expression of 18S rRNA. Results are shown as the mean fold induction over the control group ± S.D. for at least two independent experiments performed in triplicate (**P* < 0.05).

Data were analysed by ANOVA followed by Tukey's test and by Student's paired *t* test to compare different assay groups using OriginPro 7.5 software. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Effect of the inhibition of PGE₂ production on LPS-mediated induction of COX-2 and mPGES-1 expression

Expression of the enzymes COX-1, COX-2 and mPGES-1 involved in PGE₂ biosynthesis was assessed by quantitative real-time RT-PCR in the murine macrophage cell line RAW 264.7 after LPS treatment (Figure 1A). Low levels of expression of COX-1 (average *C_T* = 33.11), COX-2 (average *C_T* = 29.28)

and mPGES-1 (average *C_T* = 32.15) were observed in these cells in basal conditions. Upon LPS treatment for 24 h, COX-2 and mPGES-1 mRNA levels were up-regulated 20- and 5-fold respectively, whereas COX-1 expression was reduced by 2-fold, thus pointing to COX-2 and mPGES-1 as the main enzymes involved in enhanced PGE₂ production in LPS-treated RAW 264.7 cells. Accordingly, treatment with increasing doses (1–100 nM) of the COX-2 inhibitors Celecoxib or NS398 led to a decrease in the production of PGE₂ induced by LPS (Figure 1B).

In order to study the effect of COX-2 inhibitors on the expression of COX-2 and mPGES-1, mRNA levels were determined by quantitative real-time RT-PCR in RAW 264.7 cells treated with LPS for 24 h in the presence of increasing doses of NS398 or Celecoxib. As shown in Figures 1(C)–(F), LPS-mediated increase in COX-2 and mPGES-1 expression was

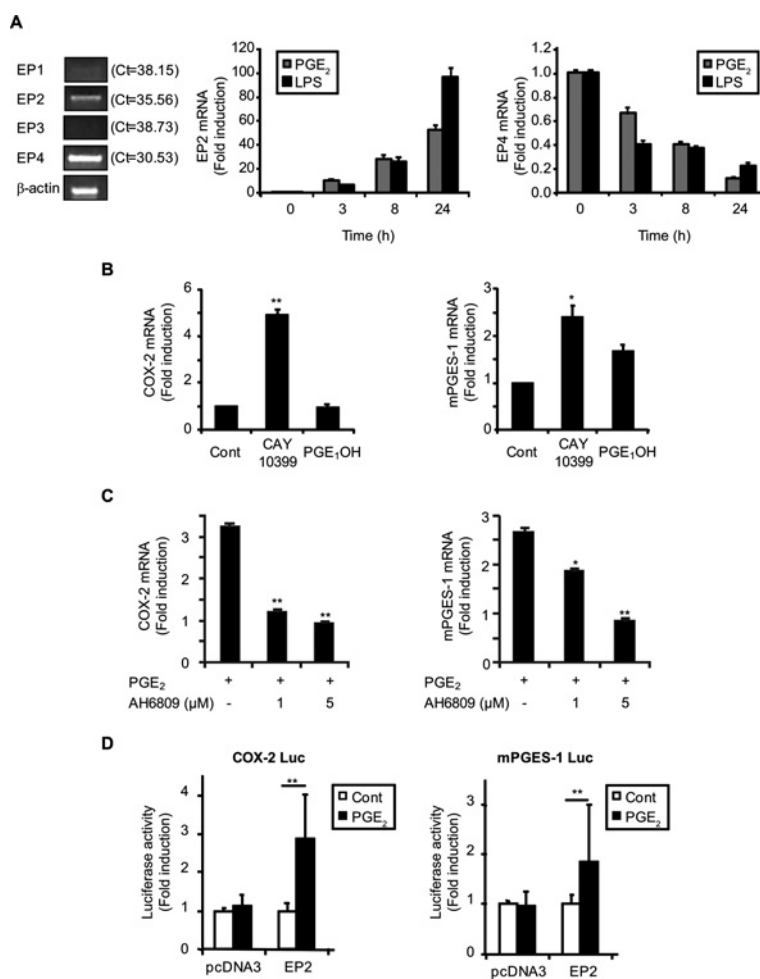


Figure 3 Involvement of EP2 receptor on the transcriptional activation of COX-2 and mPGES-1

(A) Left-hand panel: expression of EP receptors EP1, EP2, EP3 and EP4 in unstimulated RAW 264.7 macrophages. An aliquot of the amplified DNA was separated on an agarose gel and stained with ethidium bromide for qualitative comparison. The average C_T value for each gene obtained by real-time RT-PCR in basal conditions is indicated. β -Actin mRNA levels are shown as a loading control. Middle and right-hand panels: mRNA levels of EP receptors were analysed by quantitative real-time RT-PCR in RAW 264.7 cells stimulated with PGE₂ (5 μ M) or LPS (1 μ g/ml) for the time indicated (h). (B) Analysis by real-time RT-PCR of COX-2 and mPGES-1 expression in response to the EP2 agonist CAY10399 (1 μ M) or the EP4 agonist PGE₁OH (1 μ M). (C) Cells were treated with PGE₂ (5 μ M) in the presence or absence of EP2 antagonist AH6809 (1 or 5 μ M), and COX2 and mPGES-1 mRNA levels were analysed by real-time RT-PCR. Relative mRNA levels were determined using endogenous expression of 18S rRNA and is shown as fold induction \pm S.D. (D) EP2 mediates PGE₂-dependent transcriptional activation of COX2 and mPGES-1 promoters. RAW 264.7 cells were transfected with PGHS-2 medium (COX-2-Luc; Luc is luciferase) or mPGES-1-895 (mPGES-1-Luc) reporter plasmids along with empty vector (pcDNA3) or an expression vector for EP2. Transfected cells were stimulated with PGE₂ (5 μ M), and transcriptional activation of COX2 and mPGES-1 promoters was assayed. The means of replicate determinations for at least three independent assays expressed as fold induction \pm S.D. are shown. (* P < 0.05; ** P < 0.01). Cont, control.

attenuated by increasing doses of NS398 and Celecoxib (1–100 nM), suggesting that suppression of endogenous PGE₂ may cause a reduction in LPS-induced expression of mPGES-1 and COX2 mRNA. Moreover, attenuation of mPGES-1 and COX-2 expression by NSAIDs was effectively restored by exogenous PGE₂ (Figures 1C–1F).

Induction of COX-2 and mPGES-1 expression by PGE₂

In order to analyse the effect of PGE₂ on COX-2 and mPGES-1 expression, we treated murine RAW 264.7 macrophages with increasing doses of PGE₂ (0.1–10 μ M) for 24 h. Quantitative RT-PCR and Western blots showed that COX-2 and mPGES-1 expression was significantly enhanced in a dose-dependent manner by PGE₂ (Figures 2A and 2B). PGE₂ treatment led to an early induction of COX2 mRNA, whereas mPGES-1 mRNA reached peak levels at 24 h after stimulation (Figure 2C).

Furthermore, PGE₂ co-operated with LPS in the induction of COX2 and mPGES-1 mRNA levels (Figure 2D).

EP2 participates in PGE₂-dependent transcriptional induction of COX-2 and mPGES-1

Four different EP receptors mediate PGE₂-dependent intracellular signalling [14–16]. In basal conditions, murine macrophage cell lines express mainly EP2 and EP4 receptors [29–31]. Analysis of mRNA levels for the EP receptors in control RAW 264.7 cells confirmed the presence of EP2 and EP4 transcripts with very low levels of EP1 and EP3 transcripts (Figure 3A, left-hand panel). Quantitative RT-PCR analysis showed C_T values above 38 for EP1 (38.15 \pm 0.43) and EP3 (38.73 \pm 0.01) receptors, thus indicating low to negligible levels of expression. C_T values for basal expression of EP2 (35.56 \pm 0.12) and EP4 (30.53 \pm 0.03) receptors were in the low to moderate range. Upon stimulation with either PGE₂ or LPS, EP2 mRNA levels

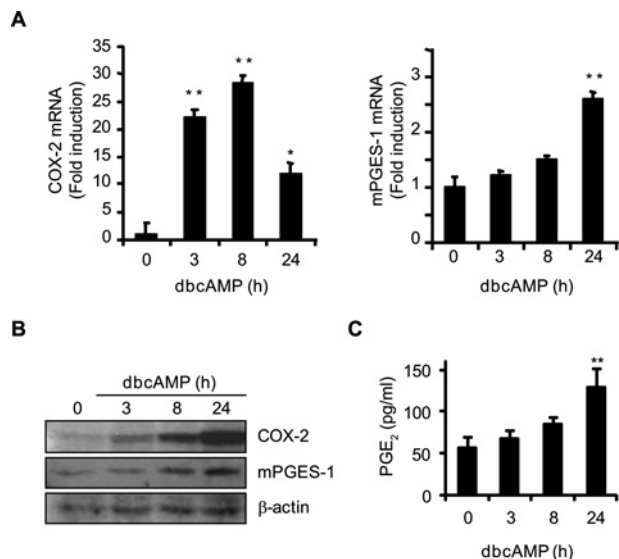


Figure 4 dbcAMP increases COX-2 and mPGES-1 expression and PGE₂ production in RAW 264.7 cells

(A) COX-2 and mPGES-1 mRNA levels from RAW 264.7 cells stimulated with dbcAMP (100 μ M) at the indicated times were determined by real-time RT-PCR. Results are shown as the mean fold induction \pm S.D. for two independent experiments performed in triplicate. (B) Western blot analysis of COX-2 and mPGES-1 protein expression in response to dbcAMP (100 μ M) at different times of treatment (h). (C) PGE₂ production by RAW 264.7 cells after stimulation with dbcAMP for different times. The results shown are the means \pm S.D. of replicate determinations for three independent assays (* P < 0.01; ** P < 0.05).

increased in a time-dependent manner. On the other hand, both PGE₂ and LPS treatment promoted a decrease in EP4 mRNA levels (Figure 3A).

Treatment of RAW 264.7 cells with the EP2 agonist CAY10399 or with the EP4 agonist PGE₁OH revealed that EP2 triggering participates in the induction of both COX2 and mPGES-1 mRNA levels (Figure 3B). Involvement of EP2 signalling in the induction of the expression of these enzymes was confirmed with the use of the EP2 antagonist AH6809, which was able to reverse PGE₂-mediated effects (Figure 3C).

Moreover, luciferase assays using COX-2 and mPGES-1 mouse promoter constructs (PGHS-2 Medium and mPGES-1-895) showed that transient expression of EP2 receptor mediated transcriptional activation of COX-2 and mPGES-1 after PGE₂ stimulation of RAW 264.7 cells (Figure 3D).

dbcAMP increases COX-2 and mPGES-1 expression

PGE₂ signalling through the EP2 receptor promoted an increase in intracellular levels of cAMP due to activation of adenylate cyclase [15]. Incubation of RAW 264.7 cells with the cell-permeant cAMP analogue dbcAMP induced an early accumulation of COX2 mRNA at 3 and 8 h, whereas a significant increase in mPGES-1 mRNA levels was detected after 24 h of treatment (Figure 4A). Analysis of protein levels by Western blotting showed an increase in COX-2 and mPGES-1 protein levels after dbcAMP treatment, with maximal induction at 24 h (Figure 4B). A co-ordinated increase in COX-2 and mPGES-1 expression after dbcAMP stimulation led to enhanced production of PGE₂ by these cells (Figure 4C).

dbcAMP co-operates with LPS in the induction of COX-2 and mPGES-1

Combined treatment of RAW 264.7 cells with LPS and dbcAMP strongly enhanced transcription of COX2 and mPGES-1 genes. Induction of COX2 and mPGES mRNA levels in

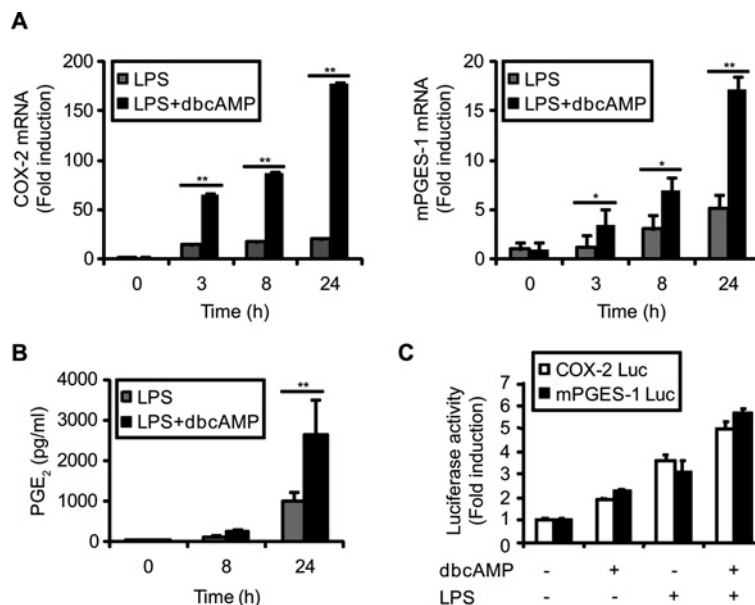


Figure 5 dbcAMP co-operates with LPS in the induction of COX-2 and mPGES-1 expression

(A) Analysis of COX-2 and mPGES-1 expression in RAW 264.7 cells after stimulation with LPS (1 μ g/ml) or LPS + dbcAMP (100 μ M) for different times (h). mRNA levels were analysed by real-time RT-PCR. A representative for three independent experiments is shown. (B) PGE₂ production in supernatants of RAW 264.7 cells treated with LPS or LPS + dbcAMP for different times. (C) LPS and dbcAMP induce transcriptional activation of COX2 and mPGES-1 promoters. Luciferase (Luc) activity of COX-2 and mPGES-1 Luc construct containing the proximal promoter regions of these genes in transfected cells treated with dbcAMP, LPS or LPS + dbcAMP for 24 h. Results for three independent experiments are shown as fold induction (observed experimental RLUs/basal RLUs in the absence of any stimuli) \pm S.D. Paired Student's t tests indicate a significant difference between the LPS and LPS + dbcAMP groups (** P < 0.01; * P < 0.05).

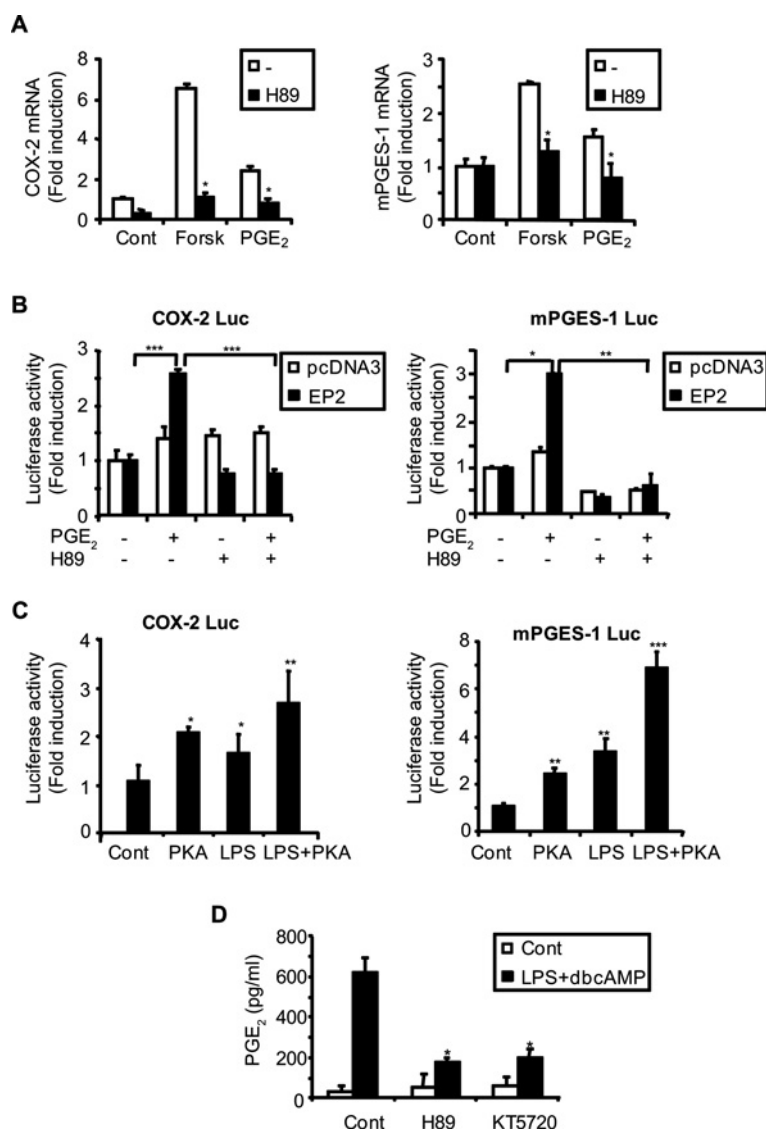


Figure 6 Involvement of PKA on COX-2 and mPGES-1 expression

(A) COX2 and mPGES-1 mRNA levels were analysed by quantitative real-time RT-PCR in cells treated with forskolin (Forsk) (10 μ M) or PGE₂ (5 μ M) for 24 h in the presence of the PKA inhibitor H89 (10 μ M). Results for two independent experiments performed in triplicate were normalized to the levels of the endogenous control 18S rRNA and are shown as fold induction \pm S.D. (B) Luciferase activity of COX-2 Luc and mPGES-1 Luc constructs were analysed in RAW 264.7 cells transiently transfected with the EP2 receptor. Cells were pre-treated with H89 1 h prior to PGE₂ stimulation for 18 h. Luciferase activity is shown as fold induction \pm S.D. A representative for three independent experiments performed in triplicate is shown. (C) Activity of COX-2 Luc and mPGES-1 Luc constructs in RAW 264.7 cells transiently transfected with an expression vector for the catalytic subunit of PKA and treated or not with LPS for 18 h. Luciferase activity is shown as fold induction \pm S.D. Statistical difference over the control group is shown (*** P < 0.005; ** P < 0.01; * P < 0.05). (D) Analysis of PGE₂ production in supernatants of RAW 264.7 cells pretreated with the PKA inhibitors H89 or KT5720 before stimulation with LPS + dbcAMP for 24 h. Results are means \pm S.D. for three experiments. Paired Student's t tests indicate a significant difference between stimulated and H89- or KT5720-treated groups (*** P < 0.005; ** P < 0.01; * P < 0.05).

these cells by LPS was enhanced in the presence of dbcAMP (Figure 5A), resulting in augmented PGE₂ production by these cells (Figure 5B). The effect of dbcAMP on LPS-mediated transcriptional activation was also analysed on COX2 and mPGES-1 promoter activity. As shown in Figure 5(C), LPS and dbcAMP co-operated in the induction of the transcriptional activity of both promoters compared with the induction after stimulation with either dbcAMP or LPS.

PKA regulates COX-2 and mPGES-1 expression by PGE₂

Signalling through the cAMP pathway leads to the activation of PKA, which in turn may activate cAMP-dependent gene transcription [32,33]. We next analysed the involvement of this

signalling pathway in the activation of COX-2 and mPGES-1 expression in RAW 264.7 macrophages. As shown in Figure 6(A), inhibition of PKA by H89 produced a decrease in the induction of COX-2 and mPGES-1 promoted by PGE₂ treatment or by activation of adenylate cyclase by forskolin. PKA inhibition was also able to abolish EP2-mediated induction of COX2 and mPGES-1 promoter activity after PGE₂ treatment (Figure 6B). Interestingly, overexpression of an expression vector for the catalytic subunit of PKA significantly increased activity of the COX2 and mPGES-1 promoters and co-operated with LPS to further induce transcriptional activation of these promoters (Figure 6C). Moreover, inhibition of PKA by either H89 or KT5720 promoted a substantial reduction in LPS + dbcAMP induction of PGE₂ production by RAW 264.7 cells (Figure 6D).

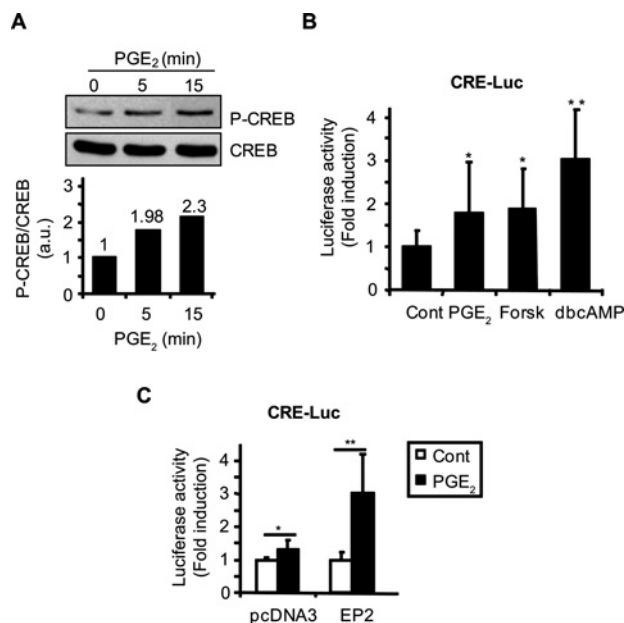


Figure 7 PGE₂ induces CRE-mediated transcriptional activation

(A) RAW 264.7 macrophages were incubated in the absence or presence of PGE₂ (5 μ M) for the indicated period of time (min). Protein extracts were separated by SDS/PAGE and levels of phosphorylated (P) and total CREB were detected by immunoblotting with specific antibodies. Relative levels of CREB phosphorylation are shown in the lower panel. (B) RAW 264.7 cells were transiently transfected with a CRE-dependent luciferase reporter plasmid (CRE-Luc) and treated with PGE₂ (5 μ M), forskolin (Forsk; 10 μ M) or dbcAMP (100 μ M) for 18 h. Results are means \pm S.D. of replicate determinations expressed as fold induction over the RLUs of unstimulated controls (Cont). Results are representative for at least two independent experiments. (C) RAW 264.7 cells were transfected with CRE-Luc reporter plasmid along with empty vector (pcDNA3) or an expression vector for EP2 receptor. Transfected cells were stimulated with PGE₂, and CRE-dependent transcriptional activation was assayed. The means of replicate determinations expressed as fold induction \pm S.D. are shown. Results are representative for at least three independent assays. * P < 0.05; ** P < 0.005.

PGE₂ induces CRE-mediated COX-2 and mPGES-1 expression

Since CREB is the main transcriptional mediator of the cAMP/PKA signal [32,33], we evaluated the effect of PGE₂ on CREB phosphorylation and CRE-mediated transcriptional activation. Incubation of RAW 264.7 cells with PGE₂ led to efficient CREB phosphorylation (Figure 7A). Furthermore, PGE₂ as well as forskolin and dbcAMP activated CRE-dependent gene transcription of a luciferase reporter construct (Figure 7B). CRE-dependent transcription upon PGE₂ stimulation was enhanced in cells co-transfected with an EP2 expression vector (Figure 7C).

Previous studies have described a functional CRE-binding site in the murine COX2 promoter [34]. We have analysed the functional significance of this CRE-binding site in PGE₂-dependent COX-2 transcriptional activity by using different deletions of the COX2 promoter in cells co-transfected with the EP2 receptor. Mutation of the sequence containing the CRE site within the COX2 gene abolished the induction of COX2 promoter activity by PGE₂ in RAW 264.7 cells (Figure 8A). Analysis of the activity of different deletions of the murine mPGES-1 promoter (mPGES-1-895, mPGES-1-694, mPGES-1-483 and mPGES-1-154) showed that deletion of the region located at position -483/-154 of the mPGES-1 transcription start site resulted in a clear reduction of the inducibility by PGE₂ (Figure 8C). Sequence analysis of this region in the mPGES-1 murine gene to identify potential CRE elements with the TRANSFAC Database and P-Match software [35] revealed the presence of two putative CRE elements (5'-tcagTGATAtgc-3'

and 5'-gtccTGAGCcaa-3') located at positions -301/-290 and -217/-206 of the mPGES-1 transcription start site, with a high score of core similarity (0.976 and 0.988) and matrix similarity (0.916 and 0.894). The upper case letters indicate the positions in the sequence that match with the core sequence of the matrix, whereas the lower case letters refer to the remaining positions of the matrix.

To confirm the involvement of CREB in the induction of COX-2 and mPGES-1 by PGE₂, we examined CREB binding to mouse COX2 and mPGES-1 promoters by ChIP assays in PGE₂-treated RAW 264.7 cells. As shown in Figures 8(B) and 8(D), PGE₂ stimulation resulted in increased binding of CREB to both COX2 and mPGES-1 promoters.

DISCUSSION

PGE₂ plays an important role in the modulation of the inflammatory and immune response through autocrine and paracrine signalling participating in the regulation of cytokine production, leucocyte migration, proliferation and differentiation [36–38]. Activation of specific EP receptors by this PG has been shown to regulate the function of many cell types including macrophages, dendritic cells and T- and B-lymphocytes, leading to both pro- and anti-inflammatory effects. Emerging results reveal that regulatory effects of PGE₂ in inflammation depend on receptor subtype, cell population and context of activation. Although mostly implicated as a pro-inflammatory agent, PGE₂ is also able to down-regulate the expression of inflammatory cytokines and chemokines from activated macrophages and dendritic cells [18–21,39,40]. Macrophages are the main source of PGE₂ generated in settings of inflammation upon activation by a stimulus such as LPS, TNF α or IL-1 β . Enhanced release of PGE₂ in response to these stimuli is due to co-ordinated up-regulation of COX-2 and mPGES-1 [41,42]. The molecular mechanisms that regulate PGE₂ synthesis by macrophages involve transcriptional and post-transcriptional processes, with NF- κ B, CREB/AP-1 (activator protein 1) and C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) transcription factors as critical modulators of COX2 gene transcription [23,26,34,43]. On the other hand, induced expression of mPGES-1 depends essentially on the transcription factor EGR-1, although other factors such as NF- κ B and Sp1 (specificity protein 1) have also been shown to participate in its regulation [13,41,44–46]. In the present study, we provide evidence that PGE₂ is able to enhance transcriptional activation of COX2 and mPGES-1 in the LPS-activated RAW 264.7 murine macrophage cell line. This PGE₂-mediated positive loop involves the activation of the EP2/cAMP/PKA signalling pathway, resulting in CREB-dependent transcriptional activation of COX2 and mPGES.

LPS treatment of RAW 264.7 cells induces the synthesis of COX-2 and mPGES-1, which is accompanied by a significant increase in the release of PGE₂. The results of the present study show that COX-2-selective inhibitors down-regulate the expression of these enzymes at a concentration dose that abrogated LPS-mediated PGE₂ production in RAW 264.7 cells, suggesting a positive regulation of this PG on the expression of COX-2 and mPGES-1. In fact, exogenous PGE₂ treatment reversed the effect of COX-2 inhibitors in LPS-stimulated RAW.264.7 cells. Moreover, PGE₂ treatment in unstimulated RAW 264.7 cells was able to induce COX2 and mPGES-1 transcriptional induction. The ability of PGE₂ to promote COX-2 and mPGES-1 expression in unstimulated cells was weak compared with LPS, but PGE₂ was able to enhance LPS-mediated up-regulation of both enzymes. Induction of COX-2 and mPGES-1 showed different kinetics,

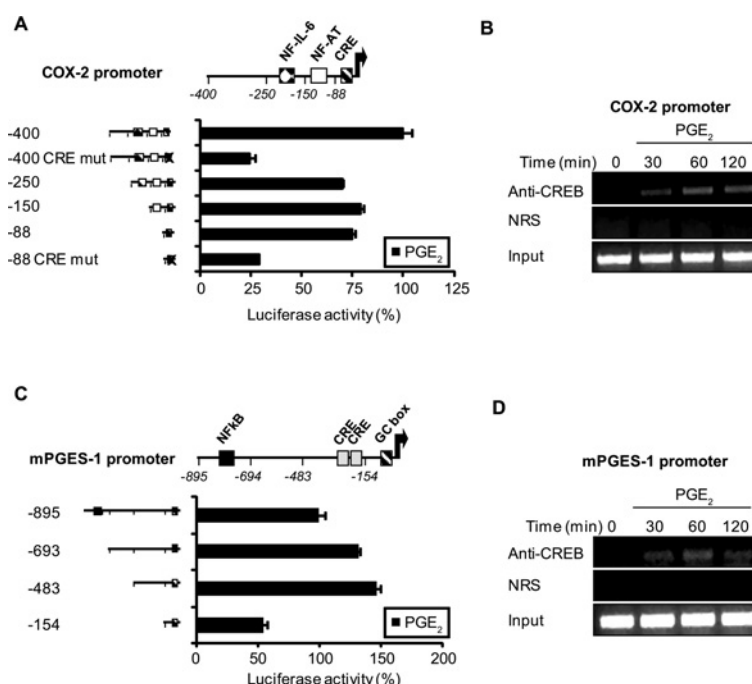


Figure 8 PGE₂-mediated activation and CREB binding in *COX2* and *mPGES-1* promoter regions

RAW 264.7 cells were transfected with different deletions of *COX2* (A) or *mPGES-1* (C) promoter constructs (described in the Experimental section) along with EP2 receptor expression vector. *Cis*-acting consensus sequences are denoted by boxes. The extent of the 5' truncations are shown with numbers indicating their length relative to the transcription start site. After transfection, cells were treated with PGE₂ (5 μ M) for 18 h and assayed for luciferase activity. Results are shown as means of fold induction (observed experimental RLUs in response to LPS/basal RLUs in the absence of any stimuli) \pm S.D. for three independent experiments. (B and D) Analysis of the specific binding of CREB to *COX2* (B) and *mPGES-1* (D) promoter regions in RAW 264.7 macrophages by ChIP assays. CREB transcription factor was immunoprecipitated from cells stimulated with PGE₂ (5 μ M) for the times indicated (min). Immunoprecipitated DNA was amplified with specific primers for the *COX2* or *mPGES-1* proximal promoter regions. As a control, PCR was performed on chromatin fragments isolated before immunoprecipitation (input). Immunoprecipitation with a NRS (normal rabbit serum) was carried out in parallel as a negative control. Results shown are representative for three experiments performed.

with a delay in mPGES-1 induction in comparison with COX-2. Although COX-2 and mPGES expression vary similarly in response to a variety of stimuli (IL-1 β , LPS, TNF α etc.), there are multiple reports showing differences in the specific timing for induction, in such a way that induction of mPGES-1 is generally delayed with respect to COX-2 in several cell systems [10–13]. These observations suggest a differential regulation of these enzymes in terms of the up-regulation and maintenance of steady-state expression levels. Some differences between these two genes that could be relevant to explain divergences in the timing of responses to the same stimuli have been reported. The promoter of human *mPGES-1* lacks a TATA box, unlike the *COX2* promoter. Furthermore, *mPGES-1* mRNA does not contain AUUUA instability motifs that are present in *COX2* mRNA [44]. The delayed induction of *mPGES* mRNA compared with *COX2* upon a stimulatory treatment can thus be explained on the basis of a smaller increase in the rate of gene transcription in the setting of a relatively stable mRNA.

PGE₂ exerts its effects through a family of G-protein-coupled receptors named EP-1, -2, -3 and -4 that differ in their signal transduction pathways. EP2 and EP4 receptors are coupled to the G_s protein and activate adenylate cyclase, increasing cAMP levels [14–16]. In agreement with previous reports analysing the expression of EP receptors in murine macrophages, we have detected the expression of EP2 and EP4 receptors in RAW 264.7 cells, with negligible levels of EP1 and EP3 receptors [29,30,47–49]. Our results show that expression levels of EP2 and EP4 receptors change inversely in such a manner that basal low levels of EP2 receptor are increased in a time-dependent manner upon LPS treatment, whereas EP4 expression diminished in stimulated RAW 264.7 cells. Moreover, a similar profile on the regulation of EP2 and EP4

mRNA levels was observed upon PGE₂ treatment. Differential regulation of EP2 and EP4 receptors upon activation or PGE₂ treatment involving cAMP signalling have been observed in murine macrophages [30,47–49]. In the present study, we provide evidence indicating the involvement of EP2 receptor in the PGE₂ positive loop by the use of EP2 receptor agonists and antagonists as well as overexpression of this receptor in RAW 264.7 cells. EP2 receptor couples to G_{ss}, leading to the activation of adenylate cyclase and increased formation of intracellular cAMP and thus activation of the cAMP-dependent protein kinase PKA. In the present study, we show that treatment of unstimulated RAW 264.7 cells with cAMP analogues or adenylate cyclase activators induced COX-2 and mPGES-1 expression, resulting in augmented PGE₂ production. These agents co-operated with LPS to further up-regulate COX-2 and mPGES-1 expression and PGE₂ production by RAW 264.7 cells. Involvement of PKA was revealed by the use of the PKA inhibitors H89 and KT5720, which down-regulated cAMP-dependent transcriptional up-regulation of COX-2 and mPGES-1. Furthermore, overexpression of a catalytic active PKA was able to induce the activity of *COX2* and *mPGES-1* promoters, both in basal and LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Activation of PKA by cAMP can result in the phosphorylation of CREB, which interacts with CREs in the regulation of cAMP-responsive gene expression [32,33]. The present study shows that PGE₂ treatment of RAW 264.7 cells induced phosphorylation of CREB at Ser¹³³, resulting in the transcriptional activation of a CRE–luciferase reporter. Induction of CREB-mediated transcriptional activation of this reporter construct could be observed in the presence of overexpressed EP2 receptor. CREB-dependent regulation of *COX2* promoter activity in response to a variety of stimuli has been observed in different cell types [34,50–52]. Our

ChIP assays showed that PGE₂ treatment led to CREB binding to the murine *COX2* promoter, but also to the *mPGES-1* promoter, involving for the first time this transcription factor in the regulation of this gene in response to cAMP-elevating agents. Moreover, analysis of the regulation of *COX2* as well as *mPGES-1* promoter activity by PGE₂ in RAW 264.7 cells not only confirmed the role of the CRE sequence in the *COX2* promoter, but also localized a PGE₂-responsive region (–483 to –154) within the murine *mPGES-1* promoter containing two putative CRE elements.

In summary, the results of the present study point to an essential role of the EP2 receptor in PGE₂-mediated regulation of COX-2 and mPGES-1 expression through the cAMP/PKA/CREB signalling pathway in RAW 264.7 cells. An autocrine PGE₂ positive feedback involving both EP2 as well as EP4 receptors has been suggested previously as a mechanism modulating COX-2 induction and PGE₂ production [51–54]. The results of the present study cannot entirely discard the involvement of EP4 receptor-mediated signalling in these effects. EP2 and EP4 receptors apparently act redundantly in some processes, although they show important functional differences that may explain their distinct roles in others [14,15]. Even though these receptors share common signal transduction pathways through the activation of adenylate cyclase, they differ in their desensitization and internalization [55,56] as well as in the signalling properties [15,57]. G_s-mediated increases in cAMP seem to play a less important role for EP4 receptor signalling compared with the EP2 receptor in such a way that inhibition of PKA by H89 is able to attenuate PGE₂-mediated phosphorylation of CREB in EP2-expressing cells, but not in EP4-expressing cells [57]. Furthermore, the existence of a functional switch from EP4 to EP2 upon macrophage treatment with LPS or with cAMP-elevating agents, in such a way that the EP4 receptor is down-regulated whereas EP2 expression levels are increased, points to EP2 as the predominant isoform in activated macrophages (the present study and [47,49]).

In summary, the present study demonstrates the existence of a positive-feedback regulation of PGE₂-synthesizing enzymes, such as COX-2, but also mPGES-1, in macrophages, which may play an important role in the actions of this PG in the modulation of the inflammatory process and the immune response.

AUTHOR CONTRIBUTION

Manuel Díaz-Muñoz designed and performed experiments and analysed data. Inés Osma-García performed experiments. Manuel Fresno contributed with financial support, supervised the interpretation of data and edited the paper prior to submission. Miguel Iniguez contributed with financial support, and participated in the conception and design of the experiments, and data analysis and interpretation, and wrote the paper. All authors discussed the results and implications and commented on the paper at all stages prior to submission.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank those who helped us with different reagents, as mentioned in the Experimental section, and María Chorro and Carmen Punzón for their excellent technical assistance. We also thank the staff of the Genomic Facility at the Scientific Park of Madrid for expert technical help.

FUNDING

This work was supported in part by grants from the Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) [grant number S-SAL-0159-2006]; the Cardiovascular Network (RECAVA) of the Instituto de Salud Carlos III [grant number RD06/0014/1013]; the European EICOSANOX integrated project [grant number LSH-CT-2004-005033]; CAM-Universidad Autónoma de Madrid [grant number CCG08-UAM/BIO-4299 (to M.A.I.)]; the Ministerio de Ciencia e Innovación, FEDER [grant numbers SAF2007-61716, SAF2010-18733 (to M.F.), and BFU2007-62659/BMC, BFU2010-21055 (to M.A.I.)]. I.O.-G. holds a predoctoral fellowship from the

Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). The Centro de Biología Molecular Severo Ochoa receives an institutional grant from the Fundación Ramón Areces.

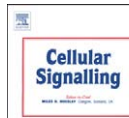
REFERENCES

- Smith, W. L., DeWitt, D. L. and Garavito, R. M. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 145–182.
- Morita, I. (2002) Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68–69**, 165–175.
- Murakami, M. and Kudo, I. (2006) Prostaglandin E synthase: a novel drug target for inflammation and cancer. *Curr. Pharm. Des.* **12**, 943–954.
- Mitchell, J. A. and Evans, T. W. (1998) Cyclooxygenase-2 as a therapeutic target. *Inflamm. Res.* **47** (suppl. 2), S88–S92.
- Liao, Z., Mason, K. A. and Milas, L. (2007) Cyclo-oxygenase-2 and its inhibition in cancer: is there a role? *Drugs* **67**, 821–845.
- Funk, C. D. and Fitzgerald, G. A. (2007) COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **50**, 470–479.
- Iniguez, M. A., Rodriguez, A., Volpert, O. V., Fresno, M. and Redondo, J. M. (2003) Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol. Med.* **9**, 73–78.
- Park, J. Y., Pillinger, M. H. and Abramson, S. B. (2006) Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin. Immunol.* **119**, 229–240.
- Samuelsson, B., Morgenstern, R. and Jakobsson, P. J. (2007) Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol. Rev.* **59**, 207–224.
- Stichtenoth, D. O., Thoren, S., Bian, H., Peters-Golden, M., Jakobsson, P. J. and Crofford, L. J. (2001) Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J. Immunol.* **167**, 469–474.
- Thoren, S. and Jakobsson, P. J. (2000) Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6428–6434.
- Inada, M., Matsumoto, C., Uematsu, S., Akira, S. and Miyaura, C. (2006) Membrane-bound prostaglandin E synthase-1-mediated prostaglandin E2 production by osteoblast plays a critical role in lipopolysaccharide-induced bone loss associated with inflammation. *J. Immunol.* **177**, 1879–1885.
- Díaz-Muñoz, M. D., Osma-García, I. C., Cacheiro-Llaguno, C., Fresno, M. and Iniguez, M. A. (2010) Coordinated up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 transcription by nuclear factor κ B and early growth response-1 in macrophages. *Cell. Signalling* **22**, 1427–1436.
- Sugimoto, Y. and Narumiya, S. (2007) Prostaglandin E receptors. *J. Biol. Chem.* **282**, 11613–11617.
- Regan, J. W. (2003) EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. *Life Sci.* **74**, 143–153.
- Hata, A. N. and Breyer, R. M. (2004) Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol. Ther.* **103**, 147–166.
- Alfranca, A., Iniguez, M. A., Fresno, M. and Redondo, J. M. (2006) Prostanoid signal transduction and gene expression in the endothelium: role in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.* **70**, 446–456.
- Seldon, P. M., Barnes, P. J., Meja, K. and Gienbycz, M. A. (1995) Suppression of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α generation from human peripheral blood monocytes by inhibitors of phosphodiesterase 4: interaction with stimulants of adenylyl cyclase. *Mol. Pharmacol.* **48**, 747–757.
- Kunkel, S. L., Spengler, M., May, M. A., Spengler, R., Larrick, J. and Remick, D. (1988) Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J. Biol. Chem.* **263**, 5380–5384.
- Hurme, M. (1990) Modulation of interleukin-1 β production by cyclic AMP in human monocytes. *FEBS Lett.* **263**, 35–37.
- Strassmann, G., Patil-Koota, V., Finkelman, F., Fong, M. and Kambayashi, T. (1994) Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. *J. Exp. Med.* **180**, 2365–2370.
- Vichai, V., Suyarnsesthakorn, C., Pittayakhajonwut, D., Sriklung, K. and Kirtikara, K. (2005) Positive feedback regulation of COX-2 expression by prostaglandin metabolites. *Inflamm. Res.* **54**, 163–172.
- Kang, Y. J., Wingerd, B. A., Arakawa, T. and Smith, W. L. (2006) Cyclooxygenase-2 gene transcription in a macrophage model of inflammation. *J. Immunol.* **177**, 8111–8122.
- Blanco, J. C., Contursi, C., Salkowski, C. A., DeWitt, D. L., Ozato, K. and Vogel, S. N. (2000) Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 regulate interferon γ -dependent cyclooxygenase 2 expression. *J. Exp. Med.* **191**, 2131–2144.
- Xie, W., Fletcher, B. S., Andersen, R. D. and Herschman, H. R. (1994) v-src induction of the TIS10/PGS2 prostaglandin synthase gene is mediated by an ATF/CRE transcription response element. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6531–6539.
- Vila-del Sol, V. and Fresno, M. (2005) Involvement of TNF and NF- κ B in the transcriptional control of cyclooxygenase-2 expression by IFN- γ in macrophages. *J. Immunol.* **174**, 2825–2833.

- 27 Schwaninger, M., Blume, R., Oetjen, E., Lux, G. and Knebel, W. (1993) Inhibition of cAMP-responsive element-mediated gene transcription by cyclosporin A and FK506 after membrane depolarization. *J. Biol. Chem.* **268**, 23111–23115
- 28 Uhler, M. D. and McKnight, G. S. (1987) Expression of cDNAs for two isoforms of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **262**, 15202–15207
- 29 Arakawa, T., Laneuville, O., Miller, C. A., Lakkides, K. M., Wingerd, B. A., DeWitt, D. L. and Smith, W. L. (1996) Prostanoid receptors of murine NIH 3T3 and RAW 264.7 cells. Structure and expression of the murine prostaglandin EP4 receptor gene. *J. Biol. Chem.* **271**, 29569–29575
- 30 Hubbard, N. E., Lee, S., Lim, D. and Erickson, K. L. (2001) Differential mRNA expression of prostaglandin receptor subtypes in macrophage activation. *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* **65**, 287–294
- 31 Katsuyama, M., Sugimoto, Y., Okano, K., Segi, E., Ikegami, R., Negishi, M. and Ichikawa, A. (1998) Characterization of the gene for the mouse prostaglandin E receptor subtype EP2: tissue-specific initiation of transcription in the macrophage and the uterus. *Biochem. J.* **330**, 1115–1121
- 32 Mayr, B. and Montminy, M. (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 599–609
- 33 Shaywitz, A. J. and Greenberg, M. E. (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 821–861
- 34 Eliopoulos, A. G., Dumitru, C. D., Wang, C. C., Cho, J. and Tschich, P. N. (2002) Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *EMBO J.* **21**, 4831–4840
- 35 Chekmenev, D. S., Haid, C. and Kel, A. E. (2005) P-Match: transcription factor binding site search by combining patterns and weight matrices. *Nucleic Acids Res.* **33**, W432–W437
- 36 Sakata, D., Yao, C. and Narumiya, S. (2010) Prostaglandin E₂, an immunoactivator. *J. Pharmacol. Sci.* **112**, 1–5
- 37 Tilley, S. L., Coffman, T. M. and Koller, B. H. (2001) Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J. Clin. Invest.* **108**, 15–23
- 38 Sakata, D., Yao, C. and Narumiya, S. (2010) Emerging roles of prostanoids in T cell-mediated immunity. *IUBMB Life* **62**, 591–596
- 39 Harizi, H. and Gualde, N. (2005) The impact of eicosanoids on the crosstalk between innate and adaptive immunity: the key roles of dendritic cells. *Tissue Antigens* **65**, 507–514
- 40 Takayama, K., Garcia-Cardena, G., Sukhova, G. K., Comander, J., Gimbrone, Jr, M. A. and Libby, P. (2002) Prostaglandin E₂ suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 44147–44154
- 41 Catley, M. C., Chivers, J. E., Cambridge, L. M., Holden, N., Slater, D. M., Staples, K. J., Bergmann, M. W., Loser, P., Barnes, P. J. and Newton, R. (2003) IL-1 β -dependent activation of NF- κ B mediates PGE₂ release via the expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase. *FEBS Lett.* **547**, 75–79
- 42 Ueno, N., Takegoshi, Y., Kamei, D., Kudo, I. and Murakami, M. (2005) Coupling between cyclooxygenases and terminal prostanoid synthases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 70–76
- 43 Wadleigh, D. J., Reddy, S. T., Kopp, E., Ghosh, S. and Herschman, H. R. (2000) Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J. Biol. Chem.* **275**, 6259–6266
- 44 Naraba, H., Yokoyama, C., Tago, N., Murakami, M., Kudo, I., Fueki, M., Oh-Ishi, S. and Tanabe, T. (2002) Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E₂ synthase gene. Essential role of the transcription factor Egr-1. *J. Biol. Chem.* **277**, 28601–28608
- 45 Ackerman, IV, W. E., Summerfield, T. L., Vandre, D. D., Robinson, J. M. and Kniss, D. A. (2008) Nuclear factor- κ B regulates inducible prostaglandin E synthase expression in human amnion mesenchymal cells. *Biol. Reprod.* **78**, 68–76
- 46 Subbaramaiah, K., Yoshimatsu, K., Scherl, E., Das, K. M., Glazier, K. D., Golijanin, D., Soslow, R. A., Tanabe, T., Naraba, H. and Dannenberg, A. J. (2004) Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in inflammatory bowel disease. Evidence for involvement of the transcription factor Egr-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 12647–12658
- 47 Ikegami, R., Sugimoto, Y., Segi, E., Katsuyama, M., Karahashi, H., Amano, F., Maruyama, T., Yamane, H., Tsuchiya, S. and Ichikawa, A. (2001) The expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and their different regulation by lipopolysaccharide in C3H/HeN peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **166**, 4689–4696
- 48 Akaogi, J., Yamada, H., Kuroda, Y., Nacionales, D. C., Reeves, W. H. and Satoh, M. (2004) Prostaglandin E₂ receptors EP2 and EP4 are up-regulated in peritoneal macrophages and joints of pristane-treated mice and modulate TNF- α and IL-6 production. *J. Leukocyte Biol.* **76**, 227–236
- 49 Katsuyama, M., Ikegami, R., Karahashi, H., Amano, F., Sugimoto, Y. and Ichikawa, A. (1998) Characterization of the LPS-stimulated expression of EP2 and EP4 prostaglandin E receptors in mouse macrophage-like cell line, J774.1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 727–731
- 50 Lo, C. J., Fu, M., Lo, F. R. and Cryer, H. G. (2000) Cyclooxygenase 2 (COX-2) gene activation is regulated by cyclic adenosine monophosphate. *Shock* **13**, 41–45
- 51 Hinz, B., Brune, K. and Pahl, A. (2000) Cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is modulated by cyclic AMP, prostaglandin E₂, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **278**, 790–796
- 52 Bradbury, D. A., Newton, R., Zhu, Y. M., El-Haroun, H., Corbett, L. and Knox, A. J. (2003) Cyclooxygenase-2 induction by bradykinin in human pulmonary artery smooth muscle cells is mediated by the cyclic AMP response element through a novel autocrine loop involving endogenous prostaglandin E₂, E-prostanoid 2 (EP2), and EP4 receptors. *J. Biol. Chem.* **278**, 49954–49964
- 53 Hinz, B., Brune, K. and Pahl, A. (2000) Prostaglandin E₂ upregulates cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**, 744–748
- 54 Kojima, F., Naraba, H., Sasaki, Y., Beppu, M., Aoki, H. and Kawai, S. (2003) Prostaglandin E₂ is an enhancer of interleukin-1 β -induced expression of membrane-associated prostaglandin E synthase in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* **48**, 2819–2828
- 55 Nishigaki, N., Negishi, M. and Ichikawa, A. (1996) Two G_s-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist. *Mol. Pharmacol.* **50**, 1031–1037
- 56 Desai, S., April, H., Nwaneshiudu, C. and Ashby, B. (2000) Comparison of agonist-induced internalization of the human EP2 and EP4 prostaglandin receptors: role of the carboxyl terminus in EP4 receptor sequestration. *Mol. Pharmacol.* **58**, 1279–1286
- 57 Fujino, H., Salvi, S. and Regan, J. W. (2005) Differential regulation of phosphorylation of the cAMP response element-binding protein after activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E₂. *Mol. Pharmacol.* **68**, 251–259

Received 14 June 2011/19 December 2011; accepted 23 January 2012

Published as BJ Immediate Publication 23 January 2012; doi:10.1042/BJ20111052



Coordinated up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 transcription by nuclear factor kappa B and early growth response-1 in macrophages

Manuel D. Díaz-Muñoz¹, Inés C. Osma-García, Cristina Cacheiro-Llaguno, Manuel Fresno², Miguel A. Íñiguez^{*,2}

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Departamento de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Nicolás Cabrera, 1, Cantoblanco, Universidad Autónoma de Madrid, 28049, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 February 2010

Received in revised form 15 May 2010

Accepted 15 May 2010

Available online 21 May 2010

Keywords:

Cyclooxygenase

Microsomal Prostaglandin E synthase

Egr-1

NF kappa B

Macrophages

Lipopolysaccharide

ABSTRACT

Prostaglandin (PG) E₂ is a potent lipid mediator that plays an essential role in inflammation, fever and pain. It is produced from arachidonic acid (AA) by a cascade of enzymatic reactions involving cyclooxygenases (COX-1 and -2) and prostaglandin E synthases (cPGES, mPGES-1 and -2). Functional coupling of the inducible enzymes COX-2 and mPGES-1 has been proposed for increased production of PGE₂ in different cell types. PGE₂ produced by macrophages plays an essential role in the pathogenesis of inflammatory diseases. Here, we have investigated the mechanisms involved in the regulation of COX-2 and mPGES-1 expressions in murine macrophages upon bacterial lipopolysaccharide (LPS) treatment. LPS stimulation induced the coordinated synthesis of COX-2 and mPGES-1 that resulted in an enhanced production of PGE₂ in RAW 264.7 macrophages. Furthermore, we show the involvement of NF-κB and Egr-1 transcription factors in the transcriptional induction of these enzymes. LPS treatment promoted specific binding of NF-κB to both COX-2 and mPGES-1 promoters. Site-directed mutagenesis, electrophoretic mobility shift assays and ChIP assays allowed the identification of a sequence acting as a NF-κB recognition site in the murine mPGES-1 promoter. Furthermore, LPS induced the expression of Egr-1 that cooperated with NF-κB in the up-regulation of COX-2 and mPGES-1. Inhibition of Egr-1 expression reduced substantially LPS-mediated induction of COX-2 and mPGES-1 expression, resulting in a decrease in PGE₂ production. Our findings point out to Egr-1 and NF-κB cooperation as determinant for PGE₂ synthesis by macrophages in inflammatory processes through the coordinated regulation of COX-2 and mPGES-1.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Prostaglandin E₂ (PGE₂) has been implicated in various physiological and pathological processes such as inflammation, pain, tumorigenesis, vascular regulation, neuronal functions, female reproduction, gastric mucosal protection, and kidney function [1,2]. PGE₂ is synthesized from arachidonic acid (AA) in two steps. The first step is catalyzed by Prostaglandin H endoperoxide synthases (PGHS), also called cyclooxygenases (COXs), which converts AA to PGH₂. Two different COXs have been reported: COX-1, described as a constitutive enzyme in many

tissues; and COX-2, induced by cytokines, growth factors or bacterial products, such as lipopolysaccharide (LPS), in different pathologic processes involving inflammation such as infectious diseases, cancer, arthritis and atherosclerosis [3,4]. The second step is the conversion of PGH₂ into PGE₂ by a reaction of isomerization catalyzed by PGE synthases (PGES). Three different PGES have been described: a cytosolic PGES (cPGES); and two membrane-bound microsomal PGES (mPGES)-1 and -2 [5,6]. cPGES is constitutively expressed in a wide variety of tissues and has been proposed to be functionally linked to COX-1 to promote immediate PGE₂ production. mPGES-2 is constitutively present in various cells and tissues and seems to be functionally coupled with both COX-1 and COX-2. mPGES-1 is a membrane-associated perinuclear protein belonging to the MAPEG (membrane-associated proteins involved in eicosanoid and GSH metabolism) family. This enzyme, that seems to be preferentially functionally coupled with COX-2, is markedly induced by inflammatory stimuli and down-regulated by anti-inflammatory drugs as glucocorticoids [7].

Large amounts of PGE₂ are generated by macrophages during the inflammatory process, due to increased expression of both COX-2 and

Abbreviations: AA, arachidonic acid; ChIP, chromatin immunoprecipitation; COX, cyclooxygenase; Egr-1, early growth response 1; LUC, luciferase; PG, prostaglandin; mPGES-1, microsomal Prostaglandin E synthase 1; cPGES, cytosolic Prostaglandin E synthase; PGHS, Prostaglandin H endoperoxide synthase.

* Corresponding author. Fax: +34 911964420.

E-mail address: mainiguez@cbm.uam.es (M.A. Íñiguez).

¹ Present address: The Babraham Institute, Babraham, Cambridge, CB22 3AT, United Kingdom.

² Manuel Fresno and Miguel A. Íñiguez are co-senior authors.

mPGES-1 [8,9]. COX-2 and mPGES-1 expression have been reported to be concordantly induced by pro-inflammatory agents as LPS, IL-1 β or TNF α , in several cell types [10–13]. Different regulatory mechanisms have been implicated in the induction of these genes in response to inflammatory stimuli, but the cellular signaling pathways that may mediate coordinated expression of COX-2 and mPGES-1 in macrophages remain unclear.

Nuclear factor (NF)- κ B is an important transcription factor implicated in innate and adaptive immune responses [14,15]. NF- κ B is a dimer composed of the association of two subunits; p65, p50 or c-rel. Generally, NF- κ B is coupled to the inhibitory protein I κ B in an inactivated state, but I κ B degradation after phosphorylation by I κ B kinase (IKK) complex allows NF- κ B translocation to the nucleus. Once in the nuclear compartment, NF- κ B dimers can activate the transcription of pro-inflammatory genes [15]. Different reports have demonstrated the involvement of NF- κ B in the transcriptional regulation of COX-2 expression after LPS or TNF α stimulation of macrophages [16–18] but there are no data about the role of NF- κ B on mPGES-1 transcription upon inflammatory stimuli in macrophages.

Early growth response factor 1 (Egr-1), also called NGFI-A, Zif268, Tis8 and Krox24, belongs to a group of early response genes induced by different stimuli such as LPS, cytokines, growth factors and hypoxia [19]. This factor has been implicated in cell growth and differentiation and in the development of chronic inflammatory diseases as atherosclerosis and arthritis [19–21]. It acts as a transcription factor through the binding to the DNA sequence GCG(G/T)GGCG, regulating expression of genes containing this element in their promoters, including mPGES-1 [6,22–24].

This study demonstrates the co-regulation of mPGES-1 and COX-2 in macrophages. Our data point to an essential role of cooperation between NF- κ B and Egr-1 transcription factors in the coordinated induction of COX-2 and mPGES-1 expression and hence in increased PGE₂ synthesis upon LPS treatment in murine macrophages.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and reagents

The mouse macrophage cell line RAW 264.7 (American Type Culture Collection) were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 5% fetal calf serum (BioWhittaker-Lonza) and 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 1000 U/ml gentamycin, 2 mM L-glutamine and 0.1 mM non-essential amino acids. Cells were treated with LPS from *Escherichia coli*, serotype 026:B6 (Sigma-Aldrich), at 1 μ g/ml. Selective COX-2 inhibitor NS398 (0.1 to 1 μ M) (Alexis Biochemicals), and NF- κ B inhibitors, SN50 (10 μ M) (Calbiochem) or CAY10470 (1 μ M) (Cayman Chemical), were added 1 h before the addition of the stimuli.

2.2. Plasmid constructs

COX-2 promoter luciferase constructs used for determining activation of COX-2 promoter activity in transiently transfected RAW 264.7 cells were: PGHS-2 “medium” (–1844) and PGHS-2 “short” (PGHS-2-965), kindly provided by Dr. S. Vogel (University of Maryland, Baltimore, MD, USA) [25]; PGHS-2-400 (–400) PGHS-2-250 (–250) constructs, generously provided by Dr. H. Herschman (University of California at Los Angeles, Los Angeles, CA, USA) [26]; PGHS-2-150 (–150), PGHS-2-88 (–88) and NF- κ B-mutated PGHS-2 “medium” and PGHS-2 “short” constructs were generated in our laboratory [17]. Luciferase constructs containing different deletions of the murine promoter of mPGES-1 were generated by cloning BglII/BamHI-flanked PCR products derived from RAW 264.7 genomic DNA into a pXP2-LUC plasmid [27] digested with BglII: mPGES-1-895 (–895 to +30), mPGES-1-694 (–694, +30), mPGES-1-483 (–483 to +30) and mPGES-1-154 (–154 to +30). Mutation of the putative

NF- κ B site in mPGES-1-895 plasmid to generate pmPGES-1-895 NF- κ B mut was performed by using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) using the oligonucleotide 5'-CGTCCGAGCACTGtAAGGGtCAAAGCAGGGAGC-3' (lowercase letters in the sequence of the primer indicate mutated positions). The sequence of all PCR-derived constructs was confirmed by fluorescent automatic DNA sequencing. Expression plasmids encoding human p65/NF- κ B (pCDNA3-p65) or I κ B α (pCDNA3-I κ B α) were a gift from Dr J. Alcamí (Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Majadahonda, Madrid, Spain).

For the study of the transcriptional activity of Egr-1, we used a construct containing two Egr-1 consensus-binding sites inserted upstream of a prolactin minimal promoter (Egr-1-Pro36LUC) [28]. The luciferase construct containing a fragment from –1368 to +43 of the 5' flanking region of the rat Egr-1 promoter in the reporter gene vector pXP1 (Egr-1-LUC), as well as the Egr-1 expression plasmid pLNCX-NGFI-A were generously provided by Dr. A. M. Pérez-Castillo (Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid, Spain) [29].

2.3. Transfection and luciferase assays

Transcriptional activity of COX-2, mPGES-1 and Egr-1 promoters was analyzed by luciferase reporter gene assays in RAW 264.7 cells transiently transfected with 250–1000 ng of DNA per 10⁶ cells using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) as recommended by the manufacturer. Co-transfections with pLNCX-NGFI-A, pCDNA3-I κ B α , pCDNA3p65 or the corresponding empty vectors were performed with 100–500 ng of DNA per 10⁶ cells. After 5 h of incubation, cells were exposed to different stimuli for the indicated time points. Cells were harvested and lysed, and luciferase activity was determined by using a luciferase assay kit (Promega) in a luminometer Monolight 2010 (Analytical Luminescence Laboratory). Transfection experiments were performed in triplicate. Results are expressed as the mean of the determinations in relative luciferase units (RLUs) \pm standard deviation (SD) or as fold induction (observed experimental RLU/basal RLU in absence of any stimulus).

2.4. siRNA transfection

RAW 264.7 cells (5×10^5) were transfected with 100 nM of Egr-1 siRNA (SiGENOME SMARTpool, M-040286-01, Dharmacon) or Control siRNA (SiGENOME Non-Targeting control siRNA #2, D-001210-02-05, Dharmacon) using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) in OPTIMEM medium (Invitrogen) during 6 h. Cells were washed with RPMI and stimulated with LPS (1 μ g/ml) in RPMI medium supplemented with 1% FCS. Protein extracts or total RNA were prepared to analyze Egr-1, COX-2 or mPGES-1 expression by Western blot or real-time RT-PCR. Supernatants of these cell cultures were used to measure PGE₂ production by ELISA.

2.5. mRNA analysis

Total RNA was obtained from cells by the TRIzol reagent RNA protocol (Invitrogen). Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed into cDNA by the RNA PCR core kit (Perkin-Elmer). cDNA was used for PCR amplification with specific primers for Egr-1, sense 5'-GCTTCCAGGTTCCCATGATCC-3' and antisense 5'-GATCTTGGTATGCCTCTTGGC-3'; and β -actin, sense 5'-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3' and antisense 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3'. The PCR reaction was amplified by 25 to 30 cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at 55 or 60 °C for 45 s, and extension at 72 °C for 45 s. Amplified cDNAs were separated by agarose gel electrophoresis and bands visualized by ethidium bromide staining. Data shown correspond to a number of cycles where the amount of amplified product is proportional to the abundance of starting material.

For quantitative real-time RT-PCR analysis, reverse transcription of total RNA was performed using the components of the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) and amplification of the COX-2 and mPGES-1 mRNA was performed using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) on an ABI PRISM 7900HT instrument (Applied Biosystems) with specific primers and Taqman MGB probes for COX-2, mPGES-1 and 18S rRNA (Applied Biosystems). All samples were run in triplicate. Quantification of gene expression by real-time RT-PCR was calculated by the comparative threshold cycle ($\Delta\Delta CT$) method following the manufacturer's instructions. Relative quantification (RQ) of mRNA levels was determined using endogenous expression of rRNA 18S and is shown in all the experiments as $RQ \pm SD$.

2.6. Immunoblot analysis

Protein extracts were obtained as previously described [17]. For whole cell extracts cells were lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 5 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml pepstatin and 1 mM PMSF) with phosphatase inhibitors (1 mM Na_3VO_4 and 1 mM NaF). Protein concentration was determined by the BCA method (Thermo Scientific). Cell lysates were subjected to Western blot analysis using SDS-PAGE gel electrophoresis as previously described [30]. After electrophoresis, the proteins were transferred to nitrocellulose membranes. The filters were incubated with the indicated antibodies and developed by the enhanced chemiluminescence system (Thermo Scientific). COX-2 and mPGES-1 protein expression was detected using a monoclonal anti-COX-2 antibody (BD Transduction Laboratories) and a polyclonal rabbit anti-mPGES-1 antibody (Cayman Chemical). Antibodies against Egr-1, I κ B α and p65 NF κ B was purchased from Santa Cruz Biotechnology. Actin levels were determined as a control of loading in each lane with a specific antibody (Santa Cruz Biotechnology).

2.7. Immunofluorescence cell staining

Cells cultured on cover-slips glasses were washed with PBS and fixed with methanol at $-20^\circ C$ for 5 min. Coverslips were blocked with 1% BSA in PBS, and incubated for 2 h with anti-COX-2 or anti-mPGES-1 primary antibodies. Secondary antibodies, conjugated to Alexa 488 or Alexa 595 (Invitrogen), were used for immunofluorescence detection. Coverslips were washed 3 times with PBS, then with H₂O and finally with 70% ethanol, and dried for 5 min. The cells were mounted with Mowiol (Calbiochem) on glass slides. Images from three independent experiments were captured with a Radiance 2000 Confocal (BioRad) coupled to an inverted microscope Axiovert S100 TV (Zeiss).

2.8. Electrophoretic mobility shift assays

Electrophoretic mobility shift assays were performed essentially as previously described [30]. Briefly, nuclear extracts (10 μ g) from RAW 264.7 cells treated with LPS at indicated times, were incubated with 2 μ g of poly (dI-dC) DNA carrier in DNA binding buffer for 10 min at RT. Then, the samples were incubated at $4^\circ C$ with [^{32}P]-labeled double-stranded oligonucleotides (150,000 cpm) for an additional 15 min. In competition experiments, a 25-fold molar excess of unlabeled oligonucleotides was added to the binding reaction mixture 10 min before the radiolabeled probe. DNA-protein complexes were resolved by polyacrylamide gel electrophoresis on a 4% nondenaturing gel and results were determined by autoradiography. The probes used contained the NF- κ B element from the human COX-2 promoter (5'-AGTGGGGACTACCCCTC-3') or the mouse mPGES-1 NF κ B sequence (5'-TCGACGCACTGGAAGGGCCAAAGCAGG-3').

2.9. Chromatin immunoprecipitation assay

Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) assays were performed as previously described [31]. RAW 264.7 cells (6×10^6) were maintained in RPMI with 0.5% FCS for 18 h prior stimulation with LPS for the indicated times. Cells were then fixed with 1% formaldehyde for 5 min at $37^\circ C$ and lysed in ice-cold lysis buffer (10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.1% NP-40 and protease inhibitors) for 10 min at $4^\circ C$. Nuclei pellet was suspended in nuclear lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 1% SDS and protease inhibitors) and incubated on ice for 10 min. DNA was sheared by sonication and lysates were cleared by centrifugation and diluted in ChIP dilution buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM, and 0.5% NonidetP-40). Lysates were precleared with salmon sperm/protein A-agarose. A sample of "input DNA" was collected at this point. Protein-DNA complexes were immunoprecipitated overnight at $4^\circ C$ with 2 μ g of the correspondent antibody or non-immune rabbit serum as a control. Antibody-protein-DNA complexes were then captured using salmon sperm DNA/protein A-agarose for 30 min followed by washes with wash buffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% NP-40, and 500 mM NaCl) and TE buffer (20 mM Tris-HCl, and 2 mM EDTA). The protein/DNA complexes were eluted using extraction buffer (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, and 2% SDS) and disrupted by heating at $65^\circ C$ overnight followed by proteinase K treatment for 2 h at $45^\circ C$. DNA was extracted with a QIAQUICK PCR Purification kit (QIAGEN). PCR was conducted using promoter specific primers: COX-2, sense 5'-CCCCGAGGGTAGTTCATGAAAGACTTCAAC-3' and antisense 5'-GGTGGAGCTGGCAGGATGCAGTCCTG-3'; mPGES-1, sense 5'-GGGAGATCTGGAGCAGAAGTCTCTGGGT-3' and antisense 5'-GGGGGATCCCTGGACTTCAACTCGGGGACACC-3'; Egr-1, sense 5'-GGAGACATCAATTGC ATCTCGG-3' and antisense 5'-GAGAGATCCCAGCGCGCA-GAAC-3'. PCR products obtained after 35 cycles were separated on 2% agarose gels.

2.10. Prostaglandin E₂ measurement

Levels of PGE₂ in the culture supernatants of control or LPS-treated RAW264.7 cells were determined using a competitive immunoassay PGE₂ EIA kit following manufacturer's instructions (Cayman Chemical).

2.11. Statistics

Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD) from at least three independent experiments performed by duplicate or triplicate. Data were analyzed by ANOVA followed by Tukey's test and by Student's *t*-test to compare different assay groups with the computer software OriginPro 7.5. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. LPS increases COX-2 and mPGES-1 expression in macrophages

To study the coordinated regulation of COX-2 and mPGES-1 expression in response to LPS in macrophages, we first analyzed the levels of mRNA by quantitative real-time RT-PCR in the murine macrophage cell line RAW 264.7. LPS treatment led to an early and coordinated induction of both COX-2 and mPGES-1 mRNAs reaching peak levels at 24 h after stimulation (Fig. 1A). To address whether mRNA induction was paralleled by protein increase, Western blot analysis was performed with extracts of RAW 264.7 cells treated for 3 to 48 h with LPS. Maximal induction of COX-2 protein was observed at 24 h, whereas the highest levels of mPGES-1 protein occurred at 48 h after LPS treatment (Fig. 1B). In agreement with the results observed by immunoblotting, immunocytochemical studies

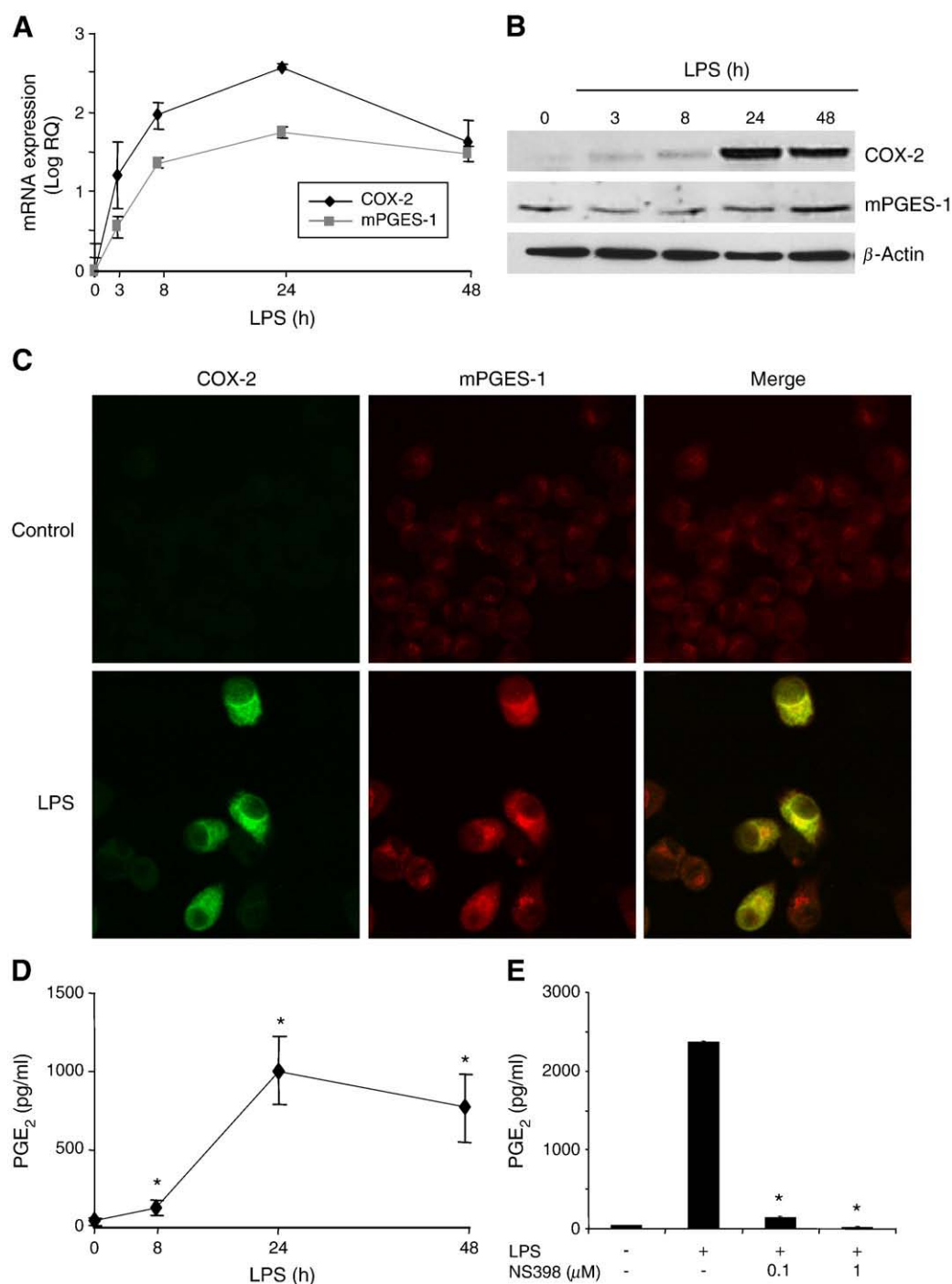


Fig. 1. LPS induces COX-2 and mPGES-1 expression and enhances PGE₂ production in RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 cells were treated with LPS (1 μg/ml) for the times indicated (hours). **A.** Analysis of COX-2 (closed squares) and mPGES-1 (open squares) mRNA levels by real-time quantitative RT-PCR. COX-2 and mPGES-1 mRNA levels were normalized to the expression of 18S rRNA and are shown as the mean of log RQ ± SD. **B.** COX-2 and mPGES-1 protein levels were analyzed by Western Blotting with extracts of RAW 264.7 cells treated with LPS at different times. β-actin protein levels were determined as a control of loading. **C.** Dual immunofluorescence cell staining of COX-2 (green) and mPGES-1 (red) in RAW 264.7 cells treated with LPS (1 μg/ml) for 24 h. Merging of COX-2 and mPGES-1 immunoreactivity yielded yellow fluorescence. **D.** PGE₂ production in cell supernatants of RAW 264.7 cells was determined by a standard EIA assay as described under "Materials and methods" at the times indicated after LPS stimulation. **E.** Effect of different doses of the COX-2 selective inhibitor NS398 (0.1 to 1 μM) in LPS-mediated PGE₂ production. The results shown are the mean ± SD of a representative experiment of at least three independent assays (**p* < 0.05).

revealed an increase in COX-2 and mPGES-1 protein expression after LPS treatment. Interestingly, co-localization of these enzymes was observed in the perinuclear region of LPS-stimulated RAW 264.7 cells (Fig. 1C). Coordinated increase in COX-2 and mPGES-1 expression were associated with enhanced PGE₂ production by these cells (Fig. 1D). The COX-2 selective inhibitor NS398 severely reduced LPS-mediated PGE₂ production thus confirming the importance of

COX-2 activity in PGE₂ production upon LPS treatment in RAW 264.7 cells (Fig. 1E).

To further explore the transcriptional regulation of these genes, we studied COX-2 and mPGES-1 promoter-driven transcription in transiently transfected RAW 264.7 cells. As shown in Fig. 2A and B, luciferase activity of COX-2-Luc and mPGES-1-Luc constructs was clearly up-regulated upon LPS activation.

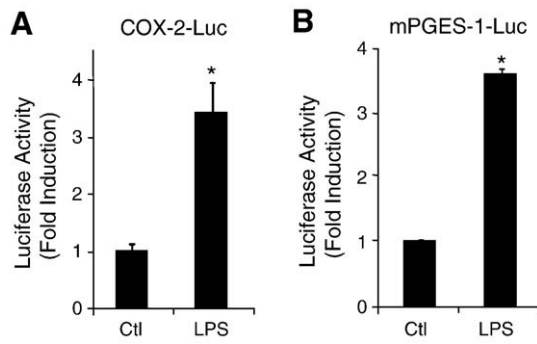


Fig. 2. Analysis of COX-2 and mPGES-1 transcriptional activation in RAW 264.7 cells. Luciferase reporter constructs containing the proximal promoter region of COX-2 (PGHS-2 medium) in A, or mPGES-1 (mPGES-1-895) in B, were transiently transfected in RAW 264.7 cells cultured in the absence or presence of LPS (1 μ g/ml) at the indicated times and assayed for luciferase activity. Results are shown as fold induction over the observed RLU in the absence of LPS treatment (Control, Ctl). Results are shown as means \pm SD of three independent experiments (* p < 0.05).

3.2. Modulation of COX-2 and mPGES-1 expression by NF- κ B

NF- κ B transcription factor plays an essential role in the transcriptional activation of COX-2 in macrophages [15,32]. However, there is no evidence for the involvement of this factor in the transcriptional activation of mPGES-1 in these cells. Functional relevance of NF- κ B activation in the transcriptional induction of COX-2 and mPGES-1 was evaluated by using inhibitors of NF- κ B such as CAY10470 and SN-50. As shown in Fig. 3A, SN-50 was able to severely reduce LPS-dependent increase in the mRNA levels of COX-2 and mPGES-1. Pretreatment of RAW 264.7 cells with the NF- κ B inhibitor CAY10470 for 1 h prior stimulation with LPS also prevented COX-2 and mPGES-1 induction (Fig. 3B). Furthermore, inhibition of NF- κ B activation resulted in a drastic reduction of PGE₂ production by LPS-activated RAW 264.7 macrophages (Fig. 3C).

To investigate the influence of NF- κ B signaling in the induction of the activity of COX-2 and mPGES-1 promoters in macrophages, RAW 264.7 cells were transiently transfected with expression vectors for the NF- κ B subunit p65 or the NF- κ B inhibitory protein I κ B α along with COX-2 or mPGES-1 promoter constructs. Overexpression of p65/NF- κ B was able to increase the transcriptional activity of both COX-2 and mPGES-1 promoters (Fig. 4A and B). On the other hand, overexpression of I κ B α led to a reduction in the LPS-dependent induction of the activity of COX-2 and mPGES-1 promoters (Fig. 4C, D). P65 and I κ B α overexpression were determined by western blot analysis (Fig. 4E).

Taken together, these results indicate that NF- κ B activation in macrophages plays an essential role, not only in COX-2 activation, but also in the transcriptional activation of mPGES-1.

3.3. NF- κ B binding to COX-2 and mPGES-1 promoters is required for LPS induction

Previous studies have described a functional NF- κ B binding site in the murine COX-2 promoter (−402/−392), involved in its transcriptional regulation by LPS or TNF α in macrophages [17,18]. We confirmed the functional significance of this NF- κ B binding site in LPS-dependent COX-2 transcriptional activity by using different deletions of the COX-2 promoter (Fig. 5A). Deletion of the region containing the NF- κ B site resulted in a 50% decrease of the luciferase activity of COX-2 promoter constructs in RAW 264.7 cells treated with LPS. Furthermore, mutation of the NF- κ B sequence in the context of the PGHS-2-965 construct, led to a similar loss of its inducibility by LPS.

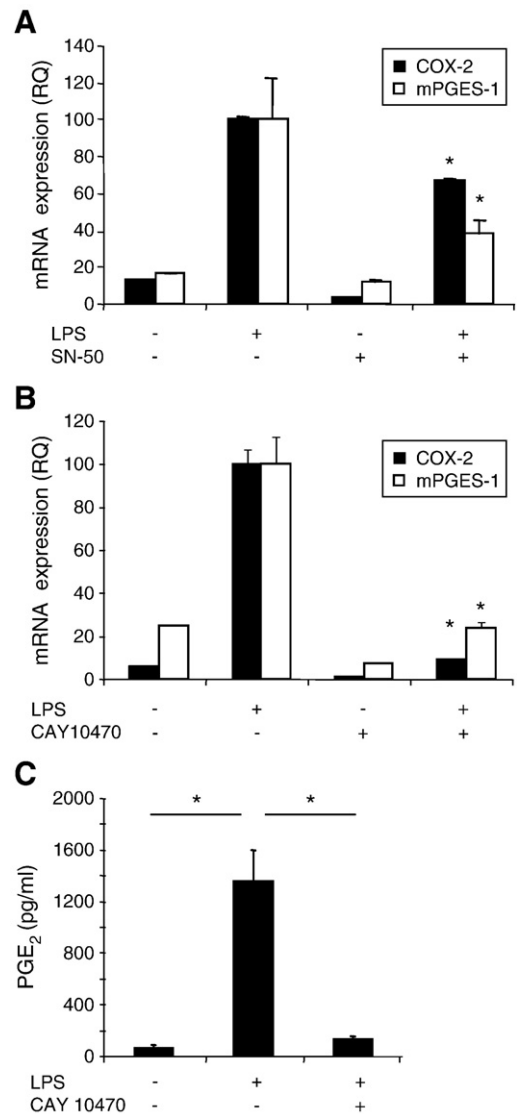


Fig. 3. Inhibition of NF- κ B activation diminishes COX-2 and mPGES-1 expression. COX-2 and mPGES-1 mRNA levels were analyzed by quantitative real-time RT-PCR in cells treated with LPS (1 μ g/ml) for 18 h. in the presence of SN-50 in A, or CAY10470 in B. NF- κ B inhibitors SN-50 (10 μ M) or CAY10470 (1 μ M) was added to RAW 264.7 cells 1 h with prior addition of LPS. Data from two independent experiments performed by triplicate were normalized to the levels of the endogenous control 18S rRNA and are shown as RQ \pm SD. C. Analysis of PGE₂ production in supernatants of RAW 264.7 cells pretreated with CAY10470 before stimulation with LPS (1 μ g/ml) for 18 h. Results are means \pm SEM from 3 experiments (* p < 0.05).

More interestingly, sequence analysis of the mPGES-1 murine gene revealed the presence of a putative NF- κ B cis-acting element located at the position −833/−824 of the mPGES-1 transcription start site. This sequence, 5'-TGGGAAGGCC-3', shares 80% identity with the general NF- κ B consensus sequence GGGRNNYYCC, (R = purine Y = pyrimidine). To address the role of this sequence in the LPS-dependent transcriptional activation of the mPGES-1 gene, we analyzed the activity of different deletions of the murine mPGES-1 promoter (mPGES-1-895, mPGES-1-694, mPGES-1-483, and mPGES-1-154). Deletion of the region containing this putative NF- κ B site resulted in a 40–50% reduction in the response to LPS (Fig. 5B). Mutation of this site in the mPGES-1-895 construct (mPGES-1-895 NF- κ B mut) further confirmed the contribution of this sequence in the regulation of mPGES-1 by LPS in macrophages.

The functionality of these sites as NF- κ B binding elements was analyzed by electrophoretic mobility shift assays with nuclear

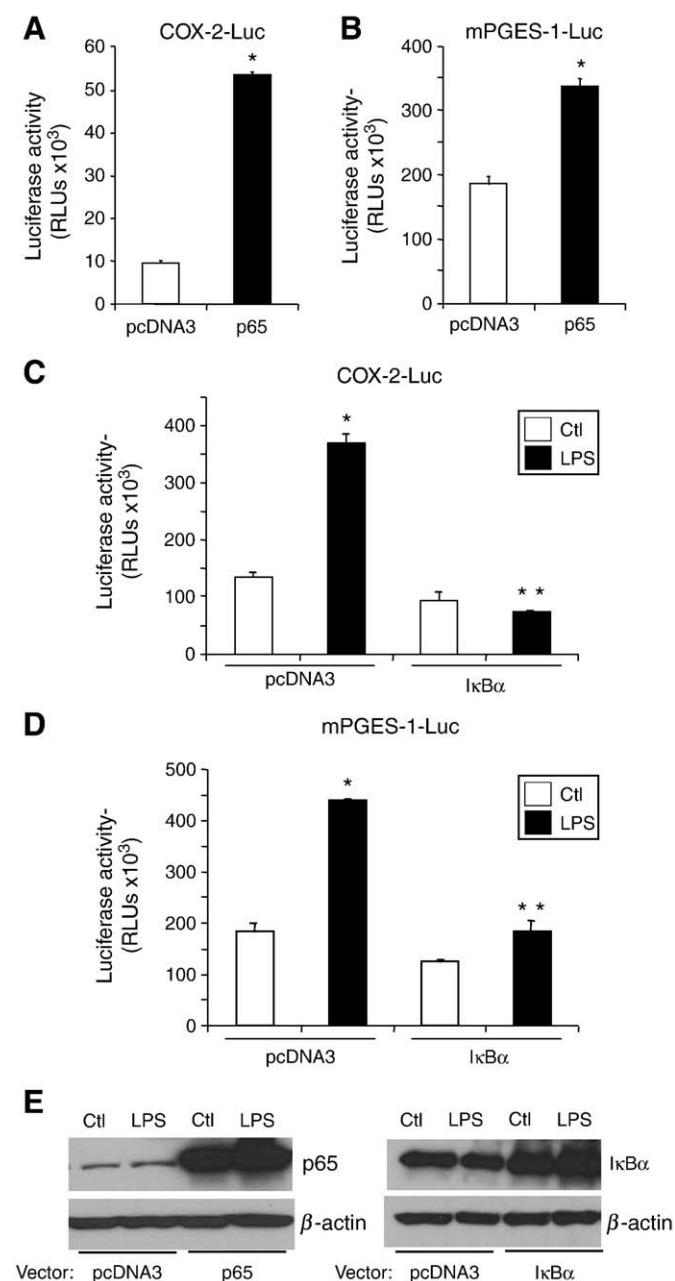


Fig. 4. Regulation of the transcriptional activity of COX-2 and mPGES-1 by NF- κ B. RAW 264.7 cells were transfected with PGHS-2 medium (COX-2-LUC) or mPGES-1-895 (mPGES-1-Luc) reporter plasmids along with empty vector (pcDNA3), or expression vectors for p65/NF- κ B in A and B or I κ B α in C and D. Transfected cells were stimulated with LPS (1 μ g/ml) as indicated, and the transcriptional activation of COX-2 and mPGES-1 promoters was assayed. The means of replicate determinations expressed as luciferase activity in RLUs \pm SD are shown. Results are representative of at least three independent assays (* p < 0.05; ** p < 0.005). E, Western blot analysis of p65 and I κ B α protein levels from total extracts of RAW 264.7 cells transfected with empty vector (pcDNA3), or expression vectors for p65/NF- κ B or I κ B α and treated or not with LPS.

extracts of RAW264 cells treated with LPS, using DNA probes of the mouse mPGES-1 NF- κ B site and the COX-2 NF- κ B site for comparison. When using the COX-2 probe, a retarded complex was resolved in nuclear extracts from RAW264 that increased upon stimulation with LPS for 2 h. Similarly, incubation of the mouse mPGES-1 NF- κ B sequence with nuclear extracts from LPS-stimulated RAW264 led to the formation of inducible DNA-protein complexes. These bands were efficiently competed with a 20-fold molar excess of unlabeled oligonucleotides (Fig. 6A).

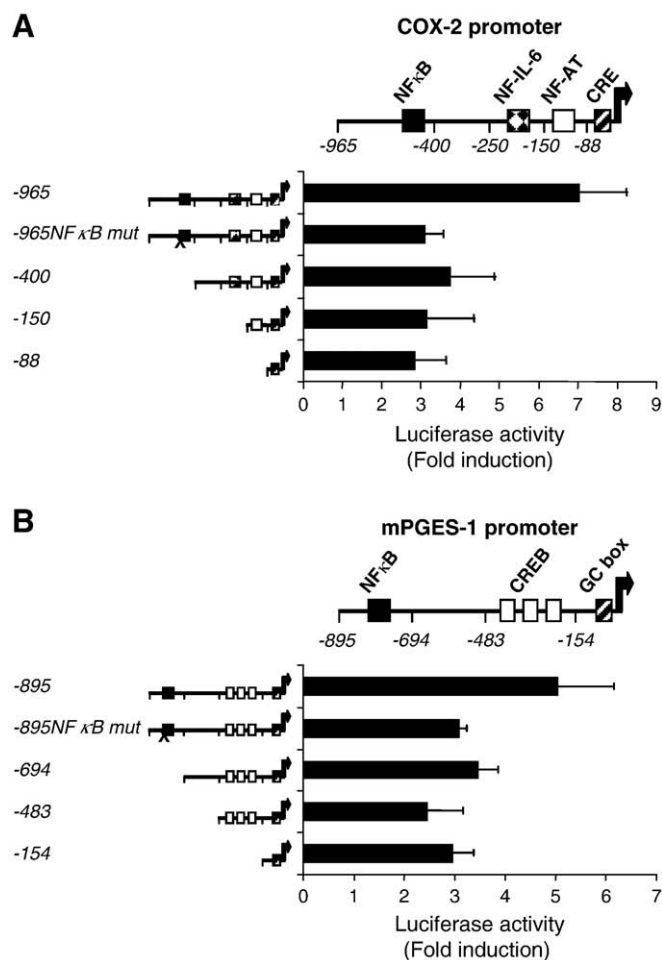


Fig. 5. Analysis of COX-2 and mPGES-1 promoter regions involved in LPS response. RAW 264.7 cells were transfected with different deletions of COX-2 (A) or mPGES-1 (B) promoter constructs (described in Materials and methods). Cis-acting consensus sequences are denoted by boxes. The extent of the 5' truncations is shown with numbers indicating their length relative to the transcription start site. After transfection, cells were treated with LPS (1 μ g/ml) for 18 h, and assayed for luciferase activity. Data are shown as means of fold induction (observed experimental RLUs in response to LPS/basal RLUs in absence of any stimuli) \pm SD of three different experiments.

In order to confirm the specific binding of NF- κ B proteins to COX-2 and mPGES-1 promoters in the context of intact macrophages, we performed ChIP assays in RAW 264.7 cells treated with LPS at different times. As shown in Fig. 6B and C, LPS stimulation of macrophages induced the binding of p65/NF- κ B to COX-2 and mPGES-1 promoters after 30 min of treatment. Minimal binding of p65 to both COX-2 and mPGES-1 promoters was observed in basal conditions, indicating specific recruitment of NF- κ B proteins to these sequences after LPS stimulation.

3.4. NF- κ B is required for Egr-1 expression in response to LPS treatment in RAW 264.7 cells

In addition to NF- κ B, LPS stimulation activates many transcription factors including the zinc finger transcription factor Egr-1 [33]. This factor has been involved in the regulation of a number of genes involved in inflammation, including mPGES-1, in response to pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β or TNF α in a variety of cell types [6,22–24,34,35]. Nevertheless, its role in the induction of COX-2 transcription is not known. Egr-1 mRNA expression, detected by RT-PCR, showed an increase after 15 min of stimulation of RAW264 cells

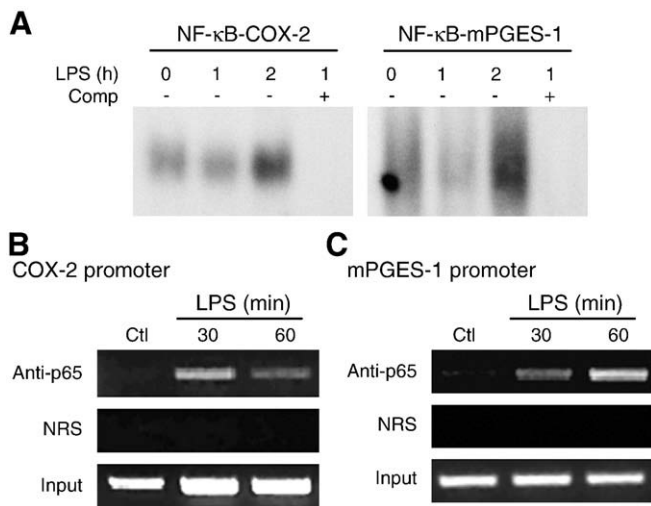


Fig. 6. NF-κB binding to COX-2 and mPGES-1 promoters upon LPS activation. **A.** Nuclear extracts from RAW 264.7 cells stimulated with LPS (1 μg/ml) for the times indicated (hours) were analyzed by electrophoretic mobility shift assays with specific probes containing the NF-κB binding sites of the human COX-2 or the mouse mPGES-1 promoters. A 20-fold molar excess of unlabeled oligonucleotides (Comp) was added to the binding reaction mixtures to determine the specific binding. **B** and **C**, analysis of the specific binding of NF-κB to COX-2 and mPGES-1 promoter regions in RAW 264.7 macrophages by ChIP assays. p65/NF-κB transcription factor was immunoprecipitated from cells stimulated with LPS (1 μg/ml) for the times indicated (minutes). Immunoprecipitated DNA was amplified with specific primers for the COX-2 (**B**) or the mPGES-1 (**C**) proximal promoter regions. As a control, PCR was performed on chromatin fragments isolated before immunoprecipitation (input). Immunoprecipitation with a normal rabbit serum (NRS) was carried out in parallel as negative control. The results shown are a representative experiment of the three experiment performed.

with LPS (Fig. 7A). Levels of Egr-1 mRNA remained elevated until 60 min and decreased thereafter. Similarly, Western Blot analysis showed an increase in Egr-1 protein levels reaching the highest levels after 60 min of treatment (Fig. 7B). Egr-1 induction was likely due to an increase in the transcriptional activation of the Egr-1 gene as luciferase activity mediated by a reporter construct containing the Egr-1 promoter (Egr-1-Luc) augmented in response to LPS in RAW 264.7 cells (Fig. 7C). Moreover, LPS activation of macrophages resulted in an enhanced transcription of a reporter construct containing the luciferase gene under the control of two tandem copies of an Egr-1 response element (Egr-1-Pro36-Luc) (Fig. 7D).

Interestingly, overexpression of p65/NF-κB significantly increased transcriptional activity of the Egr-1 promoter (Fig. 8A) whereas expression of the NF-κB inhibitory protein IκBα severely reduced the LPS-mediated transcriptional activity of this promoter (Fig. 8B). Furthermore, ChIP assays demonstrated the binding of p65/NF-κB to the Egr-1 promoter after 30 min of LPS treatment in RAW 264.7 cells (Fig. 8C), demonstrating that Egr-1 transcription is NF-κB-dependent.

3.5. NF-κB and Egr-1 cooperate in LPS-mediated COX-2 and mPGES-1 expression

We next analyzed the role of Egr-1 induction in the regulation of COX-2 and mPGES-1 expression. To examine whether Egr-1 binds specifically to mouse COX-2 and mPGES-1 promoters, we performed ChIP assays in LPS-treated RAW 264.7 cells (Fig. 9A,B). Control cells showed no Egr-1 binding, whereas LPS stimulation for 60 min resulted in increased binding of Egr-1 to both COX-2 and mPGES-1 promoters, suggesting an involvement of Egr-1 in the induction of these genes upon LPS treatment in macrophages. Moreover, Egr-1 overexpression in RAW 264.7 cells was able to increase by about two fold the luciferase activity driven by COX-2 or mPGES-1 promoters (Fig. 9C,D). Interestingly, Egr-1 cooperated with p65/NF-κB in the

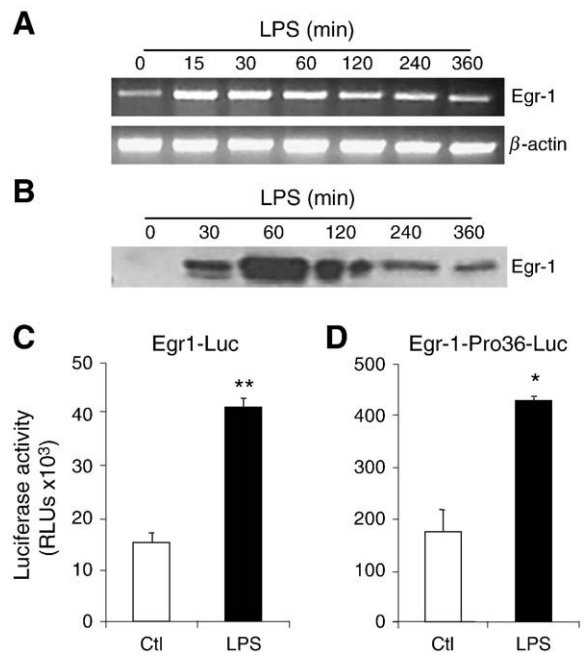


Fig. 7. Induction of Egr-1 expression by LPS in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with LPS (1 μg/ml) for the times indicated (minutes). **A.** Total RNA from RAW264 cells was analyzed by RT-PCR to measure Egr-1 or β-actin mRNA levels as a control. An aliquot of the amplified DNA was separated on an agarose gel and stained with ethidium bromide for qualitative comparison. **B.** Western blot analysis of Egr-1 protein levels from total extracts of RAW 264.7 cells treated with LPS. **C.** Luciferase activity of Egr-1-Luc construct containing the promoter of this gene in transfected cells treated with LPS for 18 h. **D.** Transcriptional activation of an Egr-1-dependent luciferase reporter in RAW 264.7 cells. Cells were transiently transfected with the Egr-1-Pro36-Luc plasmid and stimulated with LPS for 18 h. The means of replicate determinations expressed as luciferase activity in RLUs ± SD are shown. Results are representative of at least three independent assays (**p* < 0.05; ***p* < 0.001).

enhancement of the transcriptional activation of both COX-2 and mPGES-1 promoters.

3.6. Knockdown of Egr-1 diminished LPS-mediated induction of COX-2 and mPGES-1

To further confirm the involvement of Egr-1 in the induction of COX-2 and mPGES-1 in macrophages, we knocked down Egr-1 expression using a mixture of four specific siRNA duplexes. Compared with cells transfected with control siRNA, Egr-1 siRNA transfection reduced significantly Egr-1 protein levels induced by treatment with LPS for 1 h (Fig. 10A). Moreover, induction of COX-2 and mPGES-1 was partially reduced in cells transfected with Egr-1 siRNA (Fig. 10C,D). Reduction in COX-2 and mPGES-1 expression upon Egr-1 knockdown led to a reduction in the production of PGE₂ by LPS-treated RAW 264.7 cells (Fig. 10B). Taken together, these results indicate that Egr-1 participates in LPS-mediated induction of COX-2 and mPGES-1 expression in macrophages.

4. Discussion

Several lines of evidence suggest that interactions among COX and PGE synthases may involve preferential functional coupling between particular enzyme isoforms although mechanisms through which COX-derived PGH₂ is preferentially converted by one or another PGE synthase are not well understood [5,6]. COX-2 and mPGES-1 expression have been found to be concordantly induced by pro-inflammatory stimuli in several tissues, [10–13]. However, the basis of this coordinated regulation is poorly understood. Our results show that LPS promotes a high increment in the synthesis of COX-2 and

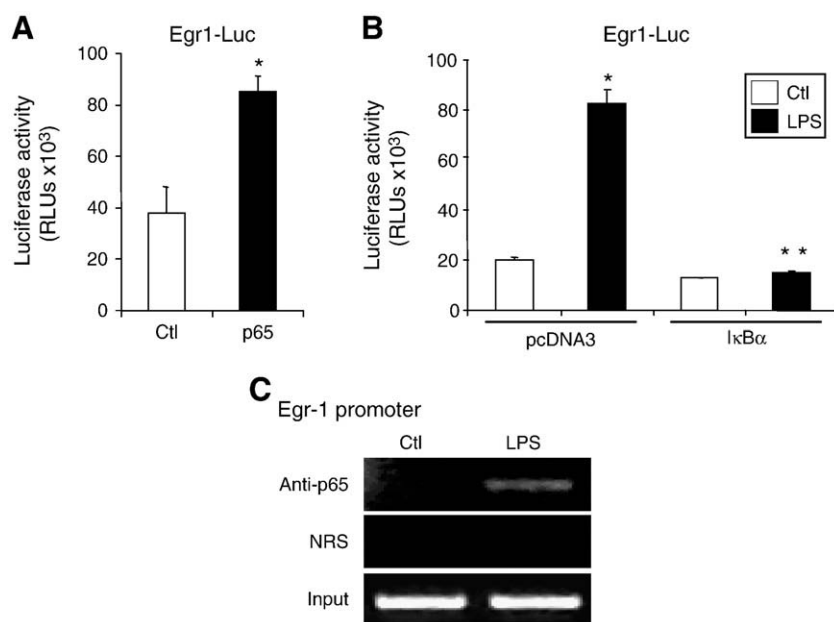


Fig. 8. Regulation of the transcriptional activity of Egr-1 by NF- κ B in macrophages. RAW 264.7 macrophages were co-transfected with the Egr-1-Luc plasmid containing the promoter region of Egr-1 and empty vector (pcDNA3), or expression vectors for p65/NF- κ B in A, or I κ B α in B. Transfected cells were stimulated with LPS (1 μ g/ml) as indicated, and the transcriptional activation of Egr-1 promoter was assayed. Results are shown as the means of replicate determinations expressed as luciferase activity in RLUs \pm SD. Results are representative of at least three independent assays (* p < 0.05; ** p < 0.005). C. Binding of p65/NF- κ B to Egr-1 promoter was analyzed by chromatin immunoprecipitation analysis in cells cultured in the absence (Control, Ctl) or presence of LPS (1 μ g/ml) for 30 min. DNA was immunoprecipitated with p65/NF- κ B antibodies or with normal rabbit serum (NRS) as a control. PCR performed on DNA fragments isolated before immunoprecipitation is shown as input. The results shown are representative of the three experiments performed.

mPGES-1 that is accompanied by a significant increase in the release of PGE₂ by these cells whereas induction of COX-1 expression was unaffected (data not shown). Indeed, LPS-mediated increase in the production of PGE₂ by RAW264.7 macrophages depended almost entirely on COX-2 activity as treatment with COX-2 selective inhibitors

as NS398 or Etoricoxib (not shown) abrogated PGE₂ production. Induction of COX-2 and mPGES-1 by LPS in RAW264.7 macrophages showed different kinetics, with a delay in mPGES-1 induction in comparison to COX-2. Induction of mPGES-1 is generally delayed with respect to COX-2 in response to pro-inflammatory stimuli as IL-1 β , LPS

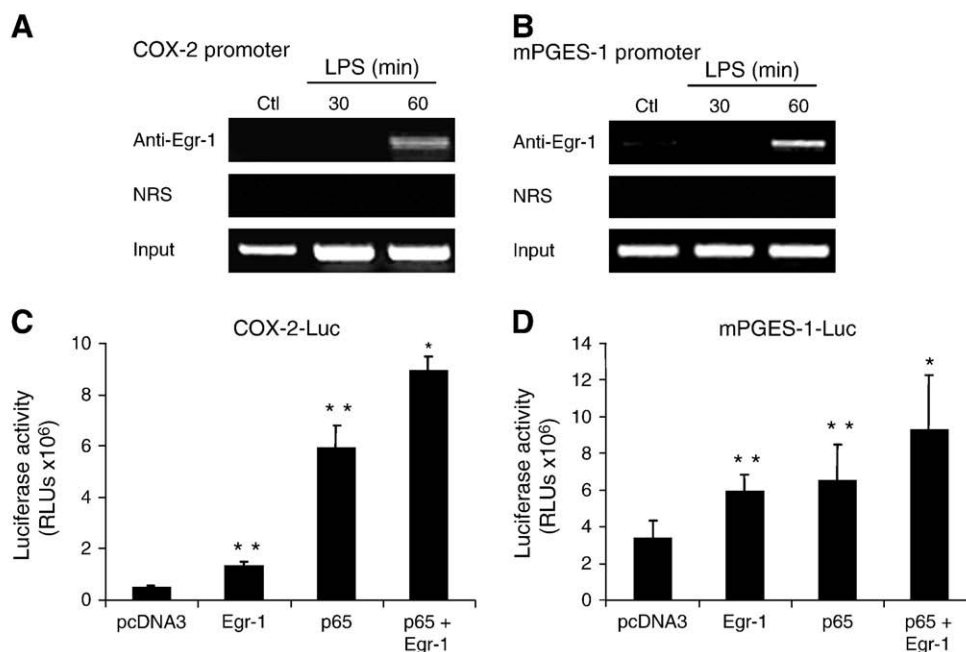


Fig. 9. Involvement of Egr-1 in COX-2 and mPGES-1 transcriptional activation. A and B, Egr-1 specific binding to COX-2 and mPGES-1 promoters in RAW 264.7 cells treated with LPS (1 μ g/ml) at indicated times (minutes) was analyzed by ChIP assays. Chromatin immunoprecipitation was performed with anti-Egr-1 antibodies or normal rabbit serum (NRS) as a control. PCR amplification was performed with specific primers for Egr-1 promoter sequence in immunoprecipitated DNA and in chromatin fragments isolated before immunoprecipitation (input). C and D, Egr-1 overexpression induces COX-2 and mPGES-1 transcriptional activation. RAW 264.7 cells were transiently transfected with the pLNCX-NGFI-A (Egr-1) and the pCMVp65/RelA (p65) expression vectors along with COX-2 (PGHS-2 medium) and mPGES-1 (mPGES-1-895) luciferase reporter constructs. Luciferase activity of these constructs was measured and results are shown as RLUs \pm SD. Paired *t*-student tests indicate a significant difference between Egr-1 or p65 groups vs. control group (** p < 0.01). Differences between Egr-1 and p65 + Egr-1 groups were also significant (* p < 0.05).

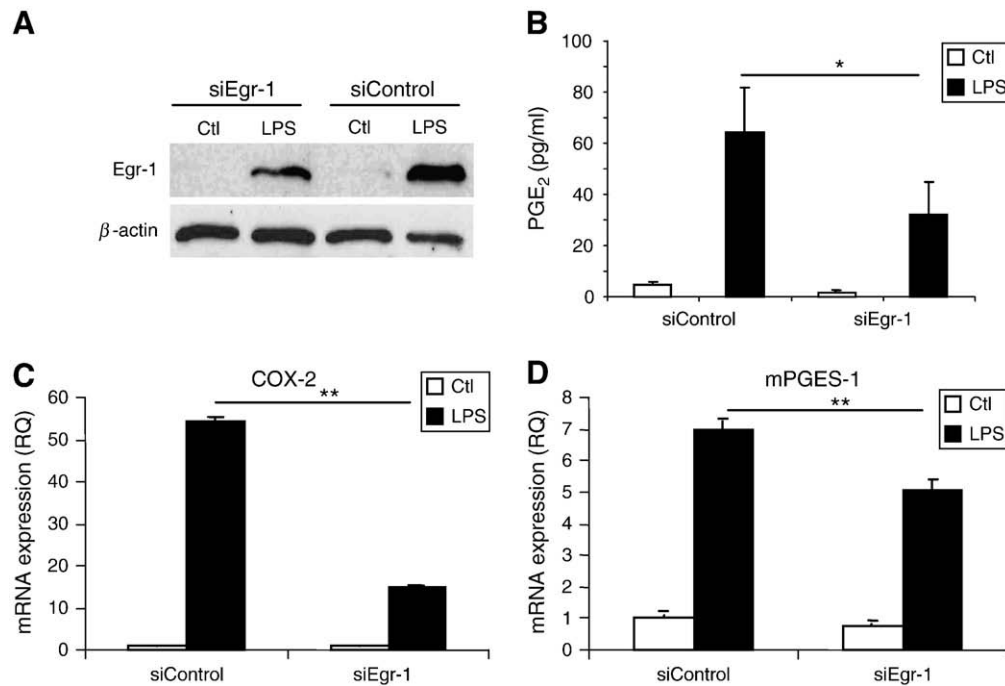


Fig. 10. Egr-1 siRNA decreases COX-2 and mPGES-1 expression. **A**, Egr-1 and β -actin protein levels in extracts of RAW 264.7 cells transiently transfected with 100 nM of control siRNA (siControl) or Egr-1 siRNA (siEgr-1) and stimulated with LPS (1 μ g/ml) for 1 h, were analyzed by Western Blot (Ctl; control). **B**, Measurement of PGE₂ production in supernatants of RAW 264.7 cells transfected with control siRNA or Egr-1-siRNA and treated for 8 h with LPS (Ctl; control). The mean of three independent experiments \pm SEM is shown (* p <0.005). **C** and **D**, Analysis of COX-2 and mPGES-1 mRNA levels by quantitative real-time RT-PCR in total RNA extracts from RAW 264.7 cells transfected with control siRNA or Egr-1-siRNA and treated or not with LPS (1 μ g/ml) for 24 h (Ctl; control). Relative quantification (RQ) of mRNA levels was determined using endogenous expression of rRNA 18S and is shown as the mean of RQ \pm SEM from two independent experiments (** p <0.05).

and TNF α in several cell systems [10–13]. In addition to coordinated transcriptional induction, these enzymes showed similar intracellular localization upon LPS treatment in RAW264.7 cells. Co-localization of these enzymes in the perinuclear region have been also observed in chondrocytes [36] and cardiac myocytes and fibroblasts stimulated with IL-1 β [37], and in HEK293 cells stably expressing transfected COX-2 and mPGES-1 [8].

We have analyzed the contribution of NF κ B and Egr-1 transcription factors in the up-regulation of these enzymes in LPS-activated murine macrophages. Interestingly, our results show the contribution of NF κ B in the up-regulation of the transcription factor Egr-1 by LPS in macrophages thus pointing to a potential cooperation between these transcription factors in the regulation of target genes involved in inflammation. Here, we present data on the contribution of NF κ B and Egr-1 transcription factors in the regulation of the coordinated expression of COX-2 and mPGES-1 and consequently, in PGE₂ production, upon LPS treatment in the murine macrophage cell line RAW 264.7. COX-2 gene expression is regulated through multiple signaling pathways, being the relative contribution of each one dependent upon the stimulus, the cellular environment and the particular cell type. Both transcriptional and post-transcriptional mechanisms have been involved in the regulation of COX-2 gene expression. The control of COX-2 transcription can be mediated by the activation of various transcription factors such as NF κ B, c/EBP, CREB, NFAT or AP-1 [32,38,39]. Different contributions, cooperations and even redundancies in the signaling pathways and promoter elements regulating COX-2 transcription in LPS-treated macrophages have been described [18,40,41]. Besides confirming the essential role of NF κ B in the regulation of COX-2 by LPS, we have described for first time the contribution of Egr-1 in the up-regulation of COX-2 in macrophages. Egr-1 bound to COX-2 promoter sequence upon LPS treatment and overexpression of Egr-1 led to induction of COX-2 promoter activity. Furthermore, blockade of Egr-1 expression by siRNA severely affected LPS mediated induction of COX-2 expression in RAW264.7 cells.

Regarding the regulation of mPGES-1 expression it is known that mPGES-1 levels are markedly induced by pro-inflammatory stimuli in various tissues and cells [22,23,34,42]. Several potential binding sites for transcription factors have been identified in the promoter region of the mPGES-1 promoter, including GC boxes; AP-1 and c/EBP response elements [43]. A number of studies have demonstrated the involvement of Egr-1 in mPGES-1 gene expression in response to different stimuli as PMA, IL-1 β , TNF α or LPS in a variety of cell types [6,22–24,34,35]. Here, we have shown the involvement of Egr-1 in the transcriptional induction of the murine mPGES-1 gene upon LPS stimulation of macrophages. Overexpression of Egr-1 augmented mPGES-1 promoter activity whereas repression of Egr-1 expression inhibited LPS-mediated mPGES-1 induction and therefore PGE₂ synthesis. Furthermore, we demonstrate the binding of Egr-1 within the murine mPGES-1 promoter in vivo by ChIP assays. In addition to Egr-1, our results show the involvement of NF κ B in the LPS-mediated transcriptional up regulation of mPGES-1 in RAW264.7 cells. Blockade of NF κ B activation with selective inhibitors or by overexpression of the NF κ B inhibitory protein I κ B α considerably diminished the LPS-dependent transcriptional activation of mPGES-1 gene whereas expression of p65/NF κ B subunit increased mPGES-1 promoter activity. Moreover, ChIP assays demonstrated the recruitment of p65/NF κ B to the murine mPGES-1 gene. We have identified a functional NF κ B responsive site (–833/–824) in the murine mPGES-1 promoter. Deletion or mutation of this NF κ B site diminished LPS-dependent transcriptional activation, confirming the functional relevance of NF κ B activation in mPGES-1 expression. Recent evidences have suggested the participation of this transcription factor in the transcriptional regulation of mPGES-1 upon IL-1 β treatment in different cell types. Transfection of the NF κ B inhibitor protein I κ B α Δ N blocks both IL-1 β -dependent mPGES-1 expression and PGE₂ synthesis in rat chondrocytes and in pulmonary A549 cells [44,45]. A recent report by Ackerman et al. support a role for NF κ B in IL-1 β -induced mPGES-1 expression in amnion mesenchymal cells in

vitro, describing the involvement of a putative NF- κ B binding site in the human mPGES-1 promoter (–542/–533) [46].

Taken together, the data reported here indicate a major role for the cooperation of transcription factors NF- κ B and Egr-1 in the coordinated regulation of the COX-2/mPGES-1 pathway for the production of PGE₂ by macrophages in inflammatory situations. Additionally we found that the Egr-1 gene itself is regulated by NF κ B. In summary, our study unravels the cellular signaling pathways involved in coordinated expression of COX-2 and mPGES-1. Because of their essential role in PGE₂ production in inflammation, pain and fever, efforts aimed to the understanding the complex molecular mechanisms involved in the regulation of COX-2 and mPGES-1 expression may help to the development of new and safer PGE₂ inhibitors as therapeutic anti-inflammatory agents.

Acknowledgments

We are grateful to those who have helped us with different reagents as mentioned in [Materials and methods](#) and to M. Chorro, C. Punzón, H. Salgado, B. Barrocal and M. Cazorla for their excellent technical assistance. We also thank M. Sanz and C. Egea for secretarial assistance and the staff of the Genomic Facility at the Scientific Park of Madrid for their expert technical help.

This work was supported in part by grants from Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) (S-SAL-0159-2006), CAM-Universidad Autónoma de Madrid (CCG08-UAM/BIO-4299), Ministerio de Ciencia e Innovación - FEDER (SAF2007-61716, BFU2007-62659/BMC), Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) (PI040993), Cardiovascular Network (RECAVA) of the Instituto de Salud Carlos III (RD06/0014/1013) and European EICOSANOX integrated project LSH-CT-2004-005033. I. C.O.G and C.C.L. hold predoctoral fellowships from FIS. The Centro de Biología Molecular Severo Ochoa receives an institutional grant from the Fundación Ramón Areces.

References

- [1] W.L. Smith, D.L. DeWitt, R.M. Garavito, *Annu. Rev. Biochem.* 69 (2000) 145.
- [2] G.A. FitzGerald, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (11) (2003) 879.
- [3] W.L. Smith, R. Langenbach, *J. Clin. Invest.* 107 (12) (2001) 1491.
- [4] J.A. Mitchell, T.W. Evans, *Inflamm. Res.* 47 (Suppl 2) (1998) S88.
- [5] J.Y. Park, M.H. Pillinger, S.B. Abramson, *Clin. Immunol.* 119 (3) (2006) 229.
- [6] M. Murakami, I. Kudo, *Curr. Pharm. Des.* 12 (8) (2006) 943.
- [7] B. Samuelsson, R. Morgenstern, P.J. Jakobsson, *Pharmacol. Rev.* 59 (3) (2007) 207.
- [8] M. Murakami, H. Naraba, T. Tanioka, N. Semmyo, Y. Nakatani, F. Kojima, T. Ikeda, M. Fueki, A. Ueno, S. Oh, I. Kudo, *J. Biol. Chem.* 275 (42) (2000) 32783.
- [9] H. Matsumoto, H. Naraba, M. Murakami, I. Kudo, K. Yamaki, A. Ueno, S. Oh-ishi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 230 (1) (1997) 110.
- [10] M. Camacho, E. Gerboles, J.R. Escudero, R. Anton, X. Garcia-Moll, L. Vila, *J. Thromb. Haemost.* 5 (7) (2007) 1411.
- [11] D.O. Stichtenoth, S. Thoren, H. Bian, M. Peters-Golden, P.J. Jakobsson, L.J. Crofford, *J. Immunol.* 167 (1) (2001) 469.
- [12] S. Thoren, P.J. Jakobsson, *Eur. J. Biochem.* 267 (21) (2000) 6428.
- [13] M. Inada, C. Matsumoto, S. Uematsu, S. Akira, C. Miyaura, *J. Immunol.* 177 (3) (2006) 1879.
- [14] R.J. Carmody, Y.H. Chen, *Cell. Mol. Immunol.* 4 (1) (2007) 31.
- [15] M.S. Hayden, A.P. West, S. Ghosh, *Oncogene* 25 (51) (2006) 6758.
- [16] F. D'Acquisto, T. Iuvone, L. Rombola, L. Sauterin, M. Di Rosa, R. Carnuccio, *FEBS Lett.* 418 (1–2) (1997) 175.
- [17] V. Vila-del Sol, M. Fresno, *J. Immunol.* 174 (5) (2005) 2825.
- [18] Y.J. Kang, B.A. Wingerd, T. Arakawa, W.L. Smith, *J. Immunol.* 177 (11) (2006) 8111.
- [19] G. Thiel, G. Cibelli, *J. Cell. Physiol.* 193 (3) (2002) 287.
- [20] L.M. Khachigian, *Circ. Res.* 98 (2) (2006) 186.
- [21] W.K. Aicher, A.H. Heer, A. Trabandt, S.L. Bridges Jr., H.W. Schroeder Jr., G. Stransky, R.E. Gay, H. Eibel, H.H. Peter, U. Siebenlist, *J. Immunol.* 152 (12) (1994) 5940.
- [22] H. Naraba, C. Yokoyama, N. Tago, M. Murakami, I. Kudo, M. Fueki, S. Oh-ishi, T. Tanabe, *J. Biol. Chem.* 277 (32) (2002) 28601.
- [23] K. Subbaramaiah, K. Yoshimatsu, E. Scherl, K.M. Das, K.D. Glazier, D. Golijanin, R.A. Soslow, T. Tanabe, H. Naraba, A.J. Dannenberg, *J. Biol. Chem.* 279 (13) (2004) 12647.
- [24] K. Sayasith, K.A. Brown, J.G. Lussier, M. Dore, J. Sirois, *J. Mol. Endocrinol.* 37 (2) (2006) 239.
- [25] J.C. Blanco, C. Contursi, C.A. Salkowski, D.L. DeWitt, K. Ozato, S.N. Vogel, *J. Exp. Med.* 191 (12) (2000) 2131.
- [26] W. Xie, B.S. Fletcher, R.D. Andersen, H.R. Herschman, *Mol. Cell. Biol.* 14 (10) (1994) 6531.
- [27] S.K. Nordeen, *Biotechniques* 6 (5) (1988) 454.
- [28] S.D. Crosby, J.J. Puetz, K.S. Simburger, T.J. Fahrner, J. Milbrandt, *Mol. Cell. Biol.* 11 (8) (1991) 3835.
- [29] M. Pignatelli, M. Cortes-Canteli, A. Santos, A. Perez-Castillo, *FEBS Lett.* 461 (1–2) (1999) 37.
- [30] J. Duque, M.D. Diaz-Munoz, M. Fresno, M.A. Iniguez, *Cell. Signal.* 18 (8) (2006) 1262.
- [31] V. Vila-del Sol, C. Punzon, M. Fresno, *J. Immunol.* 181 (7) (2008) 4461.
- [32] C. Tsatsanis, A. Androulidaki, M. Venihaki, A.N. Margioris, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38 (10) (2006) 1654.
- [33] D.L. Coleman, A.H. Bartiss, V.P. Sukhatme, J. Liu, H.D. Rupperecht, *J. Immunol.* 149 (9) (1992) 3045.
- [34] S. Cheng, H. Afif, J. Martel-Pelletier, J.P. Pelletier, X. Li, K. Farrajota, M. Lavigne, H. Fahmi, *J. Biol. Chem.* 279 (21) (2004) 22057.
- [35] Y. Moon, M. Lee, H. Yang, *Biochem. Pharmacol.* 73 (1) (2007) 125.
- [36] F. Kojima, H. Naraba, S. Miyamoto, M. Beppu, H. Aoki, S. Kawai, *Arthritis Res. Ther.* 6 (4) (2004) R355.
- [37] G. Giannico, M. Mendez, M.C. LaPointe, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288 (1) (2005) H165.
- [38] M.A. Iniguez, S. Martinez-Martinez, C. Punzon, J.M. Redondo, M. Fresno, *J. Biol. Chem.* 275 (31) (2000) 23627.
- [39] T. Tanabe, N. Tohrai, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68–69 (2002) 95.
- [40] J.R. Mestre, P.J. Mackrell, D.E. Rivadeneira, P.P. Stapleton, T. Tanabe, J.M. Daly, *J. Biol. Chem.* 276 (6) (2001) 3977.
- [41] D.J. Wadleigh, S.T. Reddy, E. Kopp, S. Ghosh, H.R. Herschman, *J. Biol. Chem.* 275 (9) (2000) 6259.
- [42] M. Soler, M. Camacho, J.R. Escudero, M.A. Iniguez, L. Vila, *Circ. Res.* 87 (6) (2000) 504.
- [43] L. Forsberg, L. Leeb, S. Thorén, R. Morgenstern, P.-J. Jakobsson, *FEBS Lett.* 471 (1) (2000) 78.
- [44] M.C. Catley, J.E. Chivers, L.M. Cambridge, N. Holden, D.M. Slater, K.J. Staples, M.W. Bergmann, P. Loser, P.J. Barnes, R. Newton, *FEBS Lett.* 547 (1–3) (2003) 75.
- [45] Y. Moon, W.C. Glasgow, T.E. Eling, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315 (2) (2005) 788.
- [46] W.E.T. Ackerman, T.L. Summerfield, D.D. Vandre, J.M. Robinson, D.A. Kniss, *Biol. Reprod.* 78 (1) (2008) 68.